

**Institut für Physiologische Chemie I
der Philipps-Universität Marburg**

**Untersuchungen zum Proteom humaner
lysosomaler Membranproteine sowie zum
Niemann-Pick Typ C-1 Protein**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades am Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von

Brigitte Simons-Klenke

aus Waiblingen

Gießen 2002

Tag der Disputation:	11. Oktober 2002
Dekan:	Herr Prof. Dr. W. Köhler, Gießen
Prüfungsvorsitzender:	Herr Prof. Dr. H. Boland, Gießen
Erstgutachter:	Herr Prof. Dr. A. Hasilik, Marburg/Lahn
Zweitgutachterin:	Frau Prof. Dr. K. Becker-Brandenburg, Gießen
Prüfer:	Herr Prof. Dr. C. Kunz, Gießen
Prüfer:	Herr Prof. Dr. E. Weigand, Gießen

Man hat mich gelehrt,
dass Fortschritt
niemals rasch
und
niemals leicht
zu erreichen ist.

Marie Curie

Für Christian

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
WISSENSCHAFTLICHE POSTER UND VORTRÄGE	XII

Kapitel		Seite
1	EINLEITUNG	1
1.1	EINFÜHRUNG IN DIE BIOLOGIE DER LYSOSOMEN	2
1.2	LYSOSOMALE PROTEINE	3
1.3	DIE LYSOSOMALE MEMBRAN: IHRE STRUKTUR UND FUNKTION	3
1.3.1	Lysosomale Membranglykoproteine	4
1.3.1.1	Biosynthese und intrazellulärer Transport	6
1.3.1.2	Funktion der lysosomalen Membranglykoproteine	8
1.3.2	Transportaufgaben der lysosomalen Membran	10
1.3.3	Biochemie und Pathophysiologie ausgewählter Transporter der lysosomalen Membran	11
1.3.3.1	Cystinosin	11
1.3.3.2	Sialinsäuretransporter	12
1.3.3.3	Lysosomale Protonenpumpe (V-Typ H ⁺ -ATPase)	13
1.3.3.4	CLN3-Protein	13
1.3.3.5	Acetyl-Coenzym A:a-Glucosaminid N-Acetyltransferase	14
1.3.3.6	Vitamin B ₁₂ -Transporter	14
1.3.3.7	Niemann-Pick Typ C-1 Protein	15
2	ZIELE DER ARBEIT	17
3	MATERIAL UND METHODEN	19

3.1	MATERIAL	19
3.1.1	Antikörper	19
3.2	METHODEN	20
3.2.1	Kultivierung und affinitätschromatographische Reinigung des monoklonalen 2D5-Antikörpers	20
3.2.2	Präparation von 2D5-C1Z-Antikörperkonjugaten	20
3.2.3	Isolierung lysosomaler Membranproteine aus humaner Plazenta	21
3.2.3.1	Isolierung der Lysosomen	21
3.2.3.2	Subzelluläre Fraktionierung	22
3.2.3.3	Herstellung lysosomaler Membranen durch Ultrazentrifugation	23
3.2.3.4	Herstellung von immunoaffinitätsgereinigten Membranen nach Diettrich et al. (1996)	24
3.2.4	Saccharose-Gradient	24
3.2.5	Enzymaktivitätstests	25
3.2.5.1	Bestimmung der β -Hexosaminidaseaktivität nach von Figura (1977)	25
3.2.5.2	Bestimmung der sauren β -Glucosidaseaktivität nach Gatt (1969)	26
3.2.5.3	Bestimmung der Acetyl-Coenzym A: α -Glucosaminid N-Acetyltransferase modifiziert nach Meikle et al. (1995)	26
3.2.5.4	Bestimmung der alkalischen Phosphatase	27
3.2.6	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	28
3.2.7	Natriumcarbonat-Behandlung nach Fujiki et al. (1982a)	28
3.2.8	Deglykosylierung lysosomaler immunoaffinitätsgereinigter Membranproteine	29
3.2.8.1	Neuraminidase – Behandlung mit anschließender Acetonfällung	29
3.2.8.2	Peptid N-Glycopeptidase-F (PNGase F) Behandlung	30
3.2.9	Trennung von Membranproteinen mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
3.2.9.1	Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele	31
3.2.9.2	Probenvorbereitung für die eindimensionale SDS-PAGE	31
3.2.9.3	Gelelektrophorese	32
3.2.10	Auftrennung von Membranproteinen durch isoelektrische Fokussierung und zweidimensionale Elektrophorese	33

3.2.10.1	Röhrchengele mit Trägerampholyten	33
3.2.10.1.1	Vertikale isoelektrische Fokussierung	33
3.2.10.1.2	SDS-PAGE im Anschluss an die vertikale isoelektrische Fokussierung	35
3.2.10.1.3	pH-Bestimmung bei fokussierten Röhrchengelen	36
3.2.10.2	Immobilisierte pH-Gradienten	36
3.2.10.2.1	Horizontale isoelektrische Fokussierung	36
3.2.10.2.2	SDS-PAGE im Anschluss an die horizontale isoelektrische Fokussierung	37
3.2.11	Direkter Nachweis der über SDS-PAGE getrennten Membranproteine	38
3.2.11.1	Silberfärbung zweidimensionaler SDS-Polyacrylamidgele nach Heukeshoven und Dernick (1988)	38
3.2.11.2	Silberfärbung zweidimensionaler SDS-Polyacrylamidgele mit Glutaraldehyd nach Heukeshoven und Dernick (1986)	39
3.2.11.3	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung	40
3.2.12	Western-Blotting	40
3.2.13	Immundetektion nach Western-Blotting	41
3.2.13.1	Nachweis mittels Meerrettichperoxidase	43
3.2.13.2	Nachweis mittels alkalischer Phosphatase	44
3.3	Auswertung	44
4	ERGEBNISSE	45
4.1	AUFREINIGUNG UND ANREICHERUNG LYSOSOMALER MEMBRANPROTEINE	45
4.2	ZWEIDIMENSIONALE SDS-GELELEKTROPHORESE	46
4.2.1	Zweidimensionale Auftrennung lysosomaler Membranproteine unter Verwendung von immobilisierten pH-Gradienten beziehungsweise freien Trägerampholyten für die isoelektrische Fokussierung	47
4.2.1.1	Bestimmung des pH-Wertes fokussierter Röhrchengele mit Trägerampholyten	49
4.2.2	Vergleich zweier Silberfärbemethoden nach Heukeshoven und Dernick (1988 und 1986)	50
4.2.3	Auftrennung lysosomaler Membranproteine im präparativen Maßstab	52
4.2.4	Nachweis des lysosomal assoziierten Membranproteins 2 (LAMP-2) im Western-Blot	54

4.2.5	Zweidimensionaler Vergleich ultrazentrifugierter und immunoaffinitäts- gereinigter lysosomaler Membranproteine	56
4.2.6	Natriumcarbonat-Behandlung	58
4.2.6.1	Enzymatische Charakterisierung lysosomaler Membranproteine nach Natriumcarbonat-Behandlung	58
4.2.6.2	Zweidimensionale Darstellung der lysosomalen Membranproteine im Anschluss an eine Natriumcarbonat-Behandlung	59
4.2.7	Deglykosylierung lysosomaler Membranproteine	61
4.2.7.1	Enzymatische Spaltung Asparagin-gebundener N-Glykane	61
4.2.7.2	Enzymatische Spaltung von N-Acetylneuraminsäureresten	63
4.2.7.3	Aufeinanderfolgende Spaltung von N-Acetylneuraminsäureresten und N-gebundener Oligosaccharidseitenketten	65
4.2.8	Charakterisierung des Proteoms der lysosomalen Membranproteine	67
4.3	NIEMANN-PICK TYP C-1 PROTEIN	69
4.3.1	Nachweis des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins in schweren Lysosomen	70
4.3.2	Anreicherung des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins durch die Immuno- affinitätsreinigung lysosomaler Membranproteine	71
4.3.3	Untersuchung lysosomaler Parameter im Verlauf eines Percoll®-Gra- dienten	72
4.3.3.1	Protein- und Enzymbestimmung der Fraktionen des Percoll®-Gradien- ten	73
4.3.3.2	Das Niemann-Pick Typ C-1 Protein, LAMP-2 und Kathepsin D im Ver- lauf des Percoll®-Gradienten	76
4.3.4	Immunoaffinitätsreinigung des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins im Ver- lauf des Percoll®-Gradienten	78
4.3.5	Aufreinigung des NPC-1 Proteins mit Hilfe eines Saccharose-Gradien- ten	80
4.3.6	Deglykosylierung des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins	83
4.4	Weiterführende Charakterisierung und Vergleiche der schweren und leichten Fraktionen des Percoll®-Gradienten	84
4.4.1	Lipidzusammensetzung der lysosomalen Membran	85
4.4.2	Zweidimensionale Darstellung schwerer und leichter lysosomaler Membranen	87
5	DISKUSSION	90
5.1	ZWEIDIMENSIONALE AUFTRENNUNG LYOSOMALER MEMBRANPROTEINE	90

5.2	CHARAKTERISIERUNG DER LYSOSOMALEN MEMBRAN	94
5.2.1	Natriumcarbonat-Behandlung	94
5.2.2	Glykosylierung	96
5.2.3	Niemann-Pick Typ C-1 Protein	100
5.2.4	Zusammensetzung schwerer und leichter lysosomaler Membranen, ein Vergleich	105
6	ZUSAMMENFASSUNG	109
7	LITERATUR	111
8	ANHANG	124

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
1.1 Schematische Darstellung lysosomaler Membranproteine.	5
1.2 Modell der Biosynthese und des Transportes lysosomaler Proteine (modifiziert nach Le Borgne und Hoflack, 1998b).	7
1.3 Modell des Chaperon vermittelten Transports zytosolischer Proteine in Lysosomen (modifiziert nach Cuervo und Dice, 1998).	9
2.1 Schematische Darstellung des geplanten Projektes.	18
4.1 Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung ultrazentrifugierter lysosomaler Membranproteine. Zur isoelektrische Fokussierung wurden beim oberen Polyacrylamidgel (A) ein immobilisierter pH-Gradient (IEF-Streifengel) und beim unteren Polyacrylamidgel (B) ein Röhrchengel mit Trägerampholyten verwendet.	48
4.2 Darstellung des pH-Gradienten eines isoelektrisch fokussierten Röhrchengels (oben) und des entsprechenden zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgels (unten).	49
4.3 Vergleich zweier Protokolle zur Silberfärbung von zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen.	51
4.4 Zweidimensionale Darstellung ultrazentrifugierter lysosomaler Membranproteine. Im oberen silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel (A) sind 25 µg und im unteren, Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten, SDS-Polyacrylamidgel (B) sind 250 µg Protein aufgetragen.	53
4.5 Nachweis des lysosomal assoziierten Membranproteins (LAMP-2) im Western-Blot (ECL-Nachweis in Teil A) und daraus folgende Zuordnung des Proteins im silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel (Teil B).	55
4.6 Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung ultrazentrifugierter (Bild A) und immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine (Bild B).	57
4.7 Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung lysosomaler Membranproteine nach einer Natriumcarbonat-Behandlung.	60
4.8 Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine nach einer vierstündigen Inkubation bei 37 °C ohne (Bild A) und mit Zusatz von Peptid N-Glycosidase F (Bild B).	62
4.9 Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine ohne Behandlung mit Neuraminidase (Bild A) und mit Neuraminidasebehandlung (Bild B).	64

Abbildung	Seite
4.10 Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine ohne Behandlung mit Neuraminidase und Peptid N-Glycosidase F (Bild A) und mit Neuraminidase- und Peptid N-Glycosidase F-Behandlung (Bild B).	66
4.11 Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine. Mit Zahlen von 1 bis 41 sind Proteine oder Proteingruppen markiert, die Neuraminsäurereste tragen oder an Asparagin gebundene Oligosaccharidseitenketten besitzen.	68
4.12 Nachweis des NPC-1 Proteins und der Temperaturstabilität des Antigens in ultrazentrifugierten lysosomalen Membranen der humanen Plazenta durch Western-Blotting.	70
4.13 Nachweis des NPC-1 Proteins im Western-Blot bei immunoaffinitätsgereinigten und ultrazentrifugierten lysosomalen Membranen.	72
4.14 Verteilung der sauren β -Glucosidase, der β -Hexosaminidase und des Proteins eines repräsentativen Percoll [®] -Gradienten.	74
4.15 Verteilung der <i>N</i> -Acetyltransferase und der alkalischen Phosphatase eines repräsentativen Percoll [®] -Gradienten.	74
4.16 Western-Blot von LAMP-2 und Kathepsin D im Verlauf des Percoll [®] -Gradienten.	77
4.17 Western-Blot des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins im Verlauf des Percoll [®] -Gradienten.	77
4.18 Western-Blots des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins (oben) und des LAMP-2 (unten) im Verlauf des Percoll [®] -Gradienten nach Immunoaffinitätsreinigung.	79
4.19 Western-Blot des NPC-1 Proteins (ELC-Nachweis). Dargestellt sind die gleichen Fraktionen (5 und 6) von Saccharose-Gradienten (18 bis 50 % [w/w] Saccharose) unterschiedlicher Pufferbedingungen.	80
4.20 Verlauf der sauren β -Glucosidase und des Proteins eines Gradienten mit 30 bis 50 % [w/w] Saccharose in 20 mM Natriumphosphat pH 6.8.	82
4.21 Western-Blot des NPC-1 Proteins (ECL) und des LAMP-2 (NBT/BCIP).	82
4.22 Western-Blot des NPC-1 Proteins nach Deglykosylierung mit Peptid N-Glycosidase F.	84
4.23 Prozentuale Verteilung des Cholesterols, des Sphingomyelins und der Summe der Phosphoglyceride (Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylethanolamin) verschiedener lysosomaler Präparationen.	87

Abbildung		Seite
4.24	Zweidimensionale Silbergele lysosomaler Membranproteine der schweren Fraktionen (A und C) beziehungsweise der leichten Fraktionen (B und D).	89
5.1	Zweidimensionale Darstellung ultrazentrifugierter lysosomaler Membranproteine. Die isoelektrische Fokussierung wurde bei Bild A und C mit immobilisiertem pH-Gradienten und bei Bild B und D mit Trägerampholyten durchgeführt.	91
5.2	Zweidimensionale silbergefärbte SDS-Polyacralamidgele, die im Abstand mehrerer Monate unter sonst identischen Bedingungen, einschließlich des Probenmaterials, hergestellt wurden.	93
5.3	Schematische Darstellung von Membranproteinen: (a) Typ I Transmembranprotein, (b) Typ II Transmembranprotein, (c) Typ III Transmembranprotein: Membranprotein mit mehreren Transmembrandomänen (multipass) und N- und C-Terminus im Zytosol, (d) Membranprotein mit mehreren Transmembrandomänen (multipass), sowie dem N-Terminus im Lumen und dem C-Terminus im Zytosol, (e) Membranprotein mit Lipidanker, (f) Membranprotein mit GPI-Anker und (g) peripheres Membranprotein (modifiziert nach Chou und Elrod (1999) und Wickner und Lodish (1986)).	95
5.4	Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine (identisch mit Abbildung 4.11).	99
5.5	Modell der Topologie des NPC-1 Proteins.	102
5.6	Zusammenfassende Charakterisierung des Percoll®-Gradienten.	104
5.7	Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung immunoaffinitätsgereinigter schwerer und leichter lysosomaler Membranproteine (Teil der Originalabbildung: 4.24).	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Seite
1.1 Nomenklatur und Eigenschaften lysosomaler Membranproteine (detaillierte Tabelle mit Literaturhinweisen im Anhang).	4
3.1 Zur Herstellung von ultrazentrifugierten lysosomalen Membranen verwendete Zentrifugenbecher und Rotoren bei unterschiedlichen Probenvolumina.	23
3.2 Liste der eingesetzten Proteinaseinhibitoren, deren Stammlösung und die verwendete Endkonzentration.	23
3.3 Liste der verwendeten spezifischen und unspezifischen Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen und der abschließenden Visualisierung.	42
4.1 Anreicherung lysosomaler Membranen des dichten Pools durch Ultrazentrifugation und Immunoaffinitätsreinigung. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte der spezifischen Aktivität der entsprechenden Enzyme aus 5 Plazenten.	46
4.2 Auflistung und zusammengefasste Charakterisierung der in Abbildung 4.11 hervorgehobenen immunoaffinitätsgereinigten lysosomalen Membranproteine hinsichtlich ihres apparenten Molekulargewichts (MW), des apparenten isoelektrischen Punktes (pI), des Verhaltens nach der Behandlung mit Natriumcarbonat und der Deglykosylierung mit Hilfe der Neuraminidase beziehungsweise der Peptid-N ⁴ -N-(Acetyl-β-Glucosaminyl) Asparagin Amidase (PNGase F).	68
4.3 Prozentuale Verteilung der alkalischen Phosphatase, der N-Acetyltransferase, der sauren β-Glucosidase, der β-Hexosaminidase und des Proteins in schweren und leichten Fraktionen des Percoll [®] -Gradienten.	75
4.4 Prozentuale Verteilung der Lipide in nmol lysosomaler Präparationen, Ausgangsmaterial, ultrazentrifugierte und immunoaffinitätsgereinigte Membranen der schweren und der leichten Fraktionen (dichter Pool und weniger dichter Pool).	86
5.1 Vergleichende Darstellung der Lipidzusammensetzung von Lysosomen.	106
8.1 Nomenklatur und Eigenschaften lysosomaler Membranproteine.	124
8.2 Pipettierschema zur Herstellung <u>eindimensionaler</u> SDS-Polyacrylamidgele verschiedener Gesamtacrylamidkonzentration.	127
8.3 Pipettierschema zur Herstellung <u>zweidimensionaler</u> SDS-Polyacrylamidgele verschiedener Gesamtacrylamidkonzentration.	127

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
A	Einbuchstabensymbol für Alanin
Affi	immunoaffinitätsgereinigt
Alanin	Alanin
AP	Adapter-Protein-Komplex
APP	Puffer für die alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl Phosphat
Cbl	Cobalamin
CD	Kathepsin D
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)dimethylamino-3-propansulfonat
Chol	Cholesterol
CL	Cardiolipin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Hydrochlorid
DP	dichter Pool (im Englischen: dense pool)
DTT	Dithiotreitol
E	Einbuchstabensymbol für Glutaminsäure
ECL	enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Einbuchstabensymbol für Phenylalanin
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
HMG-R	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Reduktase
Hsc 73	Hitzeschockprotein mit einem Molekulargewicht von 73 kDa (heat shock cognate protein of 73 kDa)
IAA	Iodacetamid
IEF	isoelektrische Fokussierung
ISSD	infantile sialic acid storage disease (infantile Sialinsäurespeicher- krankheit)
JNCL	juvenile neuronale Ceroid Lipofuscinose
K	Einbuchstabensymbol für Lysin
KFERQ	Lysin – Phenylalanin - Glutaminsäure - Arginin - Glutamin
LAMP	lysosomal assoziiertes Membranprotein
LAP	lysosomale saure Phosphatase
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LIMP	lysosomal integriertes Membranprotein

LyPL	Lysophospholipide
MVB	multivesikuläre Bodies
NBT	Nitroblautetrazolium
NCL	neuronale Ceroid Lipofuscinose
NPC	Niemann-Pick Typ C
NPC-1	Niemann-Pick Typ C-1 Protein
P	Einbuchstabensymbol für Prolin
PBS	phosphatgepufferter Natriumchloridpuffer
PC	Phosphatidylcholin
pCD	Prokathepsin D
PE	Phosphatidylethanolamin
Phe	Phenylalanin
PL	Phospholipide
PMSF	Phenyl-methylsulfonylfluorid
PNGase F	Peptid N-Glycosidase F
POD	Meerrettichperoxidase
Pro	Prolin
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Einbuchstabensymbol für Glutamin
R	Einbuchstabensymbol für Arginin
SD	Salla disease (Salla Krankheit)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SM	Sphingomyelin
TBS	Tris/HCl pH 7.4 gepufferte Natriumchloridlösung
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tyr	Tyrosin
UZ	ultrazentrifugiert
WDP	weniger dichter Pool (im Englischen: light-buoyancy-pool)
Y	Einbuchstabensymbol für Tyrosin
ZFF	Z-Phenyl-Phenyl-diazo-methylketon

Wissenschaftliche Poster und Vorträge

V1 Characterization of Niemann-Pick disease type C protein 1 containing vesicles

Brigitte Simons and Andrej Hasilik

International Workshop: The Niemann-Pick C lesion & the role of intracellular lipid sorting in human disease.

October 14-17, 1999, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

P1 2D separation of soluble lysosomal proteins

E. Sarnighausen, H. Shu, Y. Zhao, B. Kösters, B. Simons, R.L. Desnick and A. Hasilik

Mosbacher Kolloquium: GTP binding proteins: Central Regulators in Cell Biology

April 2 - 5, 2000, Mosbach, Deutschland

P2 Proteomic analysis of soluble lysosomal proteins

Shu, H., Desnick, R.L. Zhao, Y., Sarnighausen, E., Kösters, B., Simons, B. and Hasilik, A.

48th Conference of the American Society for Mass Spectrometry

June 12-16, 2000, Long Beach, California, USA

P3 Characterization of lysosomal membrane proteins

Brigitte Simons, Bernd Kösters and Andrej Hasilik

13th ESGLD Workshop

September 20-23, 2001, Woudschoten, Niederlande

P4 Comparison of two-dimensional separations of lysosomal proteins using reconstituted and freshly cast isoelectric focusing gels

Eric Sarnighausen, Brigitte Simons and Andrej Hasilik

13th ESGLD Workshop

September 20-23, 2001, Woudschoten, Niederlande

1 Einleitung

Die Lysosomen beziehungsweise das lysosomale System stellen den wichtigsten intrazellulären Mechanismus zum Katabolismus natürlich vorkommender endogener und exogener Makromoleküle dar (Winchester et al., 2000). Lysosomen spielen nicht nur beim zellulären Abbau, sondern auch beim zellulären Aufbau eine entscheidende Rolle. Die im Verlauf des lysosomalen Verdaus frei werdenden Aminosäuren, Monosaccharide und Lipide dienen als Vorläufer für Makromoleküle, die im Zytosol synthetisiert werden (Gahl, 1989). Um am zellulären Recycling teilnehmen zu können, müssen diese Substanzen die lysosomale Membran mit Hilfe spezifischer Transporter durchqueren. Es können allerdings nur die niedermolekularen Endprodukte des lysosomalen Verdaus die lysosomale Membran passieren, denn sie ist undurchlässig für nicht oder nur teilweise verdautes Material (Winchester et al., 2000). Ein genetischer Defekt eines für die Aufrechterhaltung des lysosomalen Systems verantwortlichen Proteins führt zur Ausbildung einer lysosomalen Speicherkrankheit.

Zur Zeit sind etwa 40 Erkrankungen bekannt, deren Ursache die pathologische Speicherung natürlich vorkommender Moleküle beziehungsweise Abbauprodukte in den Lysosomen ist. Die Einteilung der lysosomalen Speicherkrankheiten in verschiedene Klassen ist abhängig von der Art des gespeicherten Metaboliten. Es werden Mukopolysaccharidosen, Glykoproteinosen, lysosomale Glykogenspeicherkrankheiten, Sphingolipidosen, Lipidspeicherkrankheiten, multiple Enzymdefekte und lysosomale Transportdefekte unterschieden (Hopwood und Brooks, 1997).

Über das klinische Bild der lysosomalen Speicherkrankheiten gibt es weit reichende Erkenntnisse (Hopwood und Brooks, 1997). Gering sind bisher biochemische Informationen über lysosomale Membranproteine, deren Schädigung zu häufig tödlich verlaufenden Erkrankungen führen.

Die Familie der lysosomalen Membranproteine und Transporter wird immer größer. Zu den eindeutig identifizierten lysosomalen Transportern zählen der Sialinsäuretransporter (Verheijen et al., 1999) und der Cystintransporter (Town et al., 1998). Es handelt sich hierbei um die einzigen lysosomalen Membranproteine, deren Funktion und Struktur bekannt sind. Die Reinigung und Klonierung einiger anderer lysosomaler Membranproteine ist gelungen, aber ihre Funktionen sind bisher nicht bekannt.

Derzeit verhindern häufig technische Probleme Fortschritte im Bereich der Erforschung einzelner Membranproteine beziehungsweise des Proteoms der lysosomalen Membran.

1.1 Einführung in die Biologie der Lysosomen

De Duve et al. (1955) bezeichneten membranumschlossene Organellen, die eine Reihe saurer Hydrolasen enthalten, erstmals als Lysosomen. Es handelt sich dabei um ubiquitäre Organellen eukaryoter Zellen die von Protozoen, über grüne Pflanzen bis hin zum Menschen anzutreffen sind (Bainton, 1981). Die Vakuole der Hefe und anderer Pflanzen entspricht dem Lysosom (Bainton, 1981). Lysosomen zeichnen sich durch einen ausgeprägten Polymorphismus aus (Rome et al., 1979; Pertoft et al., 1978). Anders als andere intrazelluläre Organellen können die Lysosomen somit nicht durch die einfachen morphologischen Kriterien wie Größe, Form und innere Struktur identifiziert werden (de Duve, 1983).

Ein Protein gilt als lysosomal, wenn es in den Lysosomen prinzipiell vorkommt. Das Vorhandensein eines lysosomalen Proteins ist jedoch kein ausreichendes Kriterium, um ein Organell als lysosomal zu bezeichnen. Proteine, die hauptsächlich in Lysosomen zu detektieren sind, können in kleinen Mengen auch in Endosomen, oder der Plasmamembran als normaler Teil des endozytotischen Prozesses vorkommen, ebenso im Golgi-Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum als Teil der Proteinbiosynthese (Storrie, 1988).

Nach Storrie (1988) muss ein als Lysosom bezeichnetes Organell folgende Kriterien erfüllen: eine membranumgebene Vakuole, die reich ist an reifen Formen einer Reihe saurer Hydrolasen, von Glycosidasen bis hin zu Proteinasen. Des weiteren handelt es sich um das Endkompartiment des endozytotischen Pfades und unterscheidet sich von Zwischenstufen dieses Kompartiments. Schließlich verhalten sich Lysosomen im nativen Zustand in Zellfraktionierungsversuchen als dichtes Organell. Ein weiteres Kennzeichen der reifen Lysosomen ist der niedrige luminale pH-Wert. Er liegt bei etwa 4.7 und wird durch eine Adenosintriphosphat (ATP) getriebene Protonenpumpe erzeugt (de Duve, 1983), die von Arai et al., 1993 gereinigt und charakterisiert wurde.

Die mit Hilfe eines Dichtegradienten aus kolloidalem Silika durchgeführte Fraktionierung von Zellorganellen führte zur Auftrennung zweier Organellpopulationen, die in unterschiedlich dichten Bereichen vorkamen, aber die biochemischen Eigenschaften von Lysosomen zeigten (Rome et al., 1979). In den dichteren Fraktionen wurden hauptsächlich kleine, runde oder längliche Lysosomen, und in den weniger dichten Fraktionen sowohl heterogene Lysosomen als auch Mitochondrien, rauhes endoplasmatisches Retikulum und Plasmamembran nachgewiesen (Rome et al., 1979). Die positive Beziehung zwischen der Dichte und dem Alter der Lysosomen wurde beschrieben (Pertoft et al., 1978). Es konnte gezeigt werden, dass in „schwereren“ Lysosomen der Abbau von Proteinen deutlich stärker ist als in den

„leichteren“ Lysosomen (Pertoft et al., 1978). Bainton (1981) unterscheidet weiterhin zwischen primären und sekundären Lysosomen. Bei ersteren handelt es sich um Organellen, deren Enzyme inaktiviert sind und noch nicht am Prozess des lysosomalen Verdaus teilgenommen haben (Bainton, 1981). Es wird im Gegensatz dazu davon ausgegangen, dass in der Mehrzahl der sekundären Lysosomen ein saurer luminaler pH-Wert vorliegt, was zur Aktivierung der lysosomalen Enzyme führt (Bainton, 1981).

1.2 Lysosomale Proteine

Die lysosomalen Proteine lassen sich in zwei Hauptklassen einteilen, in die Membranproteine und im Lumen die löslichen Matrixproteine. Zu letzteren gehören die meisten lysosomalen sauren Hydrolasen, Proteinasen, Glykosidasen, Sulfatasen, Phosphatasen, Lipasen und Aktivatorproteine (Hopwood und Brooks, 1997). Nach Singer und Nicolson (1972) werden die Membranproteine in zwei Unterklassen eingeteilt: die der integralen Membranproteine, die nur löslich sind unter Bedingungen, die zur Zerstörung der Lipiddoppelschicht der Membran führt (Fujiki, 1982a) und die der peripheren Membranproteine, die sich durch Veränderungen des pH-Wertes oder der Ionenstärke von der Membran lösen. Dabei bleibt die Lipiddoppelschicht der Membran erhalten (Singer und Nicolson, 1972).

1.3 Die lysosomale Membran: Ihre Struktur und Funktion

Der Verdau von Makromolekülen findet im Inneren der Lysosomen statt und wird durch eine Mischung vornehmlich hydrolytischer Enzyme mit einem sauren pH-Optimum katalysiert (Bainton, 1981). Daraus leitet sich auch die Notwendigkeit einer unversehrten lysosomalen Membran ab. Nur hierdurch ist es möglich, die Zelle vor autolytischen Schäden zu schützen (de Duve, 1983).

Die lysosomale Membran besitzt eine einfache Phospholipiddoppelschicht (de Duve, 1983). Sie kontrolliert den Transport von Substanzen in die Lysosomen und aus ihnen heraus. Die lysosomale Membran ist weiterhin in der Lage, mit Vesikeln zu fusionieren beziehungsweise zytosolisches Material einzuschließen (Winchester, 2001; de Duve, 1983). Eine der wichtigsten Funktionen besteht in der Aufrechterhaltung eines sauren pH-Wertes im Lumen der Lysosomen (Winchester, 2001) mittels der lysosomalen ATP-abhängigen Protonenpumpe, einer V-Typ H^+ -ATPase (Arai et al., 1993).

1.3.1 Lysosomale Membranglykoproteine

Die lysosomale Membran enthält einige stark glykosylierte Proteine, die in allen Lysosomen nachgewiesen werden können (Hunziker und Geuze, 1996). Je nach untersuchter Spezies und Entdecker werden sie meistens als lysosomal assoziierte Membranproteine (LAMP's), lysosomal integrierte Membranproteine (LIMP's) oder lysosomale Membranglykoproteine (lgp's) bezeichnet (Tabelle 1.1).

LAMP-1 und LAMP-2 gehören nach Wickner und Lodish (1985) zur Klasse der Typ I Membranproteine, mit einer membrandurchspannenden Domäne und zytosolischem C-Terminus. Sie sind strukturell ähnlich. Beim Menschen weisen sie eine 37-prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz auf (Fukuda, 1991).

Tab. 1.1: **Nomenklatur und Eigenschaften lysosomaler Membranproteine (detaillierte Tabelle mit Literaturhinweisen im Anhang).**

	LAMP-1	LAMP-2	LIMP-I (LAMP-3)	LIMP-II
<i>Synonyme</i>				
Mensch	h-lamp-1 hLAMP-1 lamp A	h-lamp-2 hLAMP-2	CD63 ME 491	hLGP85
Ratte	LIMP-III lgp 120 LGP 107	lgp 110	LIMP-I	LIMP-II lgp 80 rLGP85
Maus	m-LAMP-1 lgp A	m-LAMP-2 lgp 110 lgp B		M-LGP85
Huhn	CV 24 Antigen LEP100			
<i>Eigenschaften</i>				
Molekulargewicht (kDa)	90-120	110-120	30-60	74-85
Polypeptidkette (Anzahl Aminosäuren)	382-416	390-408	237-238	478
Transmembrandomänen	1	1	4	2
Anteil der Kohlenhydrate (%)	49-67	59-67	17-58	33-36
N-Glykosylierungsstellen	17-20	16-17	3	10-11
O-Glykosylierung	ja	ja	?	?
C-terminales Gly-Tyr-Motiv	ja	ja	ja	nein
C-terminales Di-Leucin-Motiv	nein	nein	nein	ja

LIMP-I (Barriocanal et al., 1986), das auch als LAMP-3 (Fukuda, 1991) bezeichnet wird, ist identisch mit dem CD63- (Metzelaar et al., 1991) und dem ME-491-Antigen (Hotta et al.,

1988). Aus der Aminosäuresequenz ergeben sich vier Transmembrandomänen, die auf ein Typ III Membranprotein mit zytosolischer N- und C-terminaler Struktur schließen lassen.

LIMP-II (Barriocanal. et al., 1986), identisch mit LGP85 (Tabuchi et al., 1997; Fujita et al., 1992) und Igp80 (Lewis et al., 1985) beziehungsweise rLGP85 (Fujita, 1991), gehört mit seinen zwei die Membran durchspannenden Domänen ebenso zur Klasse der Typ III Membranproteine (Vega et al., 1991).

Bei der in Abbildung 1.1 dargestellten Vorläuferform der sauren lysosomalen Phosphatase (LAP) (EC 3.1.3.2) handelt es sich um ein integrales Membranprotein. Es wird als Typ I Membranprotein synthetisiert und zu den lysosomalen Membranproteinen gezählt (Gottschalk et al., 1989; Waheed et al., 1988).

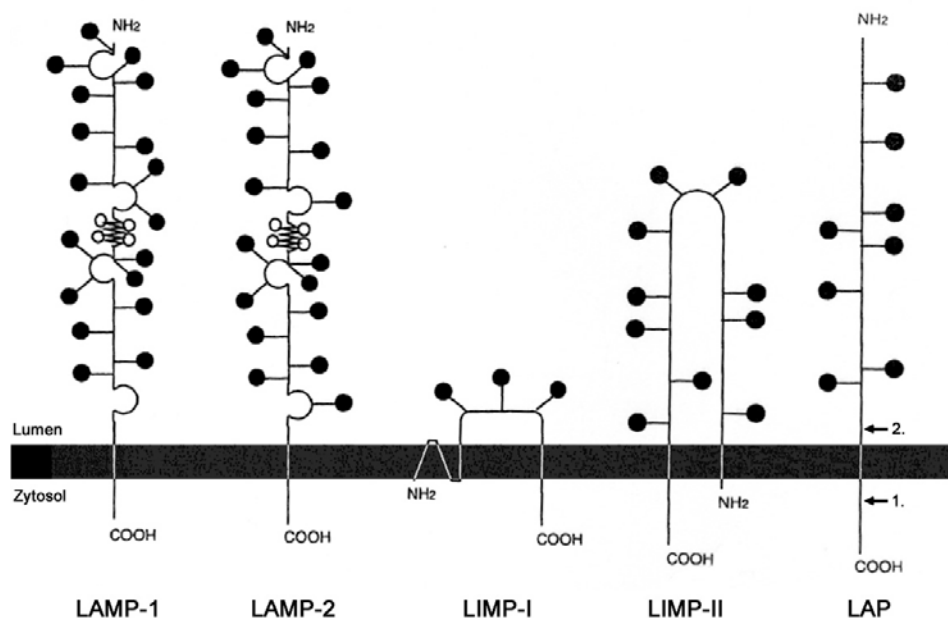


Abb. 1.1: **Schematische Darstellung lysosomaler Membranproteine.** Die ausgefüllten Kreise stellen N-glykosidisch verknüpfte und die nicht ausgefüllten Kreise stellen O-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharide dar (nach Hunziker und Geuze, 1996). Die Pfeile bei der LAP markieren die proteolytischen Schnittstellen der membrangebundenen Vorläuferform. Zuerst findet die durch eine Thiolproteinase katalysierte, Spaltung am zytosolischen Rest statt (1.). Anschließend folgt die durch eine Aspartylproteinase katalysierte, Spaltung an der luminalen Schnittstelle (2.) (Gottschalk et al., 1989).

Bei allen bisher isolierten und charakterisierten lysosomalen Membranproteinen handelt es sich um Glykoproteine. Wie aus Tabelle 1.1 zu ersehen ist, kann der prozentuale Kohlenhydratanteil je nach Protein zwischen 17 und 67 % liegen. Sowohl die LAMP's, die LIMP's, als auch LAP sind N-glykosyliert und tragen an Asparagin geknüpfte Oligosaccharidseiten-

ketten (Akasaki et al., 1992; Croze et al., 1989; Mane et al., 1989; Carlsson et al., 1988; Rupa und Whitehall, 1988; Barriocanal et al., 1986; Lippincott-Schwartz und Fambrough, 1986; Lewis et al., 1985). Nur bei LAMP-1 und LAMP-2 konnte eine zusätzlich O-Glykosylierung nachgewiesen werden (Fukuda, 1991; Carlsson et al., 1988).

Bei den luminalen lysosomalen Proteinen dient die Zuckerstruktur als Erkennungssignal für den über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor gerichteten Transport von Enzymen ins lysosomale Kompartiment (Kornfeld und Mellman, 1989). Der zelluläre Transport der lysosomalen Membranproteine verläuft unabhängig vom Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Karlsson und Carlsson, 1998). Wahrscheinlich dienen die Zuckerstrukturen der Membranproteine primär ihrem Schutz vor den lysosomalen Verdauungsenzymen (Kundra und Kornfeld, 1999; Barriocanal et al., 1986). Mit ihren unter anderem aus Polylaktosamino-glykan bestehenden Oligosaccharidseitenketten bilden die integralen lysosomalen Membranproteine, aus denen die lysosomale Membran zu etwa 50 % besteht (Hunziker und Geuze, 1996), eine Art innerer Auskleidung der Lysosomen (Barriocanal et al., 1986), die eventuell auch anderen Proteinen der lysosomalen Membran als Schutz vor den luminalen, sauren Hydrolasen dient.

1.3.1.1 Biosynthese und intrazellulärer Transport

Lysosomale Membranproteine werden an Ribosomen synthetisiert, die mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum assoziiert sind. Im endoplasmatischen Retikulum findet die N-Glykosylierung statt, bevor die lysosomalen Membranproteine in Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert werden. Während das Molekül den Golgi-Apparat zum Trans-Golgi-Netzwerk „durchwandert“ werden die N-Glykane prozessiert und O-verknüpfte Glykane hinzugefügt (Kornfeld und Kornfeld, 1985).

Für den Transport der lysosomalen Membranproteine vom Trans-Golgi-Netzwerk zu den Lysosomen werden mehrere Wege diskutiert: Einerseits wird beschrieben, dass die Proteine zuerst zur Zelloberfläche transportiert werden und anschließend über endozytotische Prozesse über die Endosomen zu den Lysosomen gelangen (Peters und von Figura, 1994; Braun et al., 1989). Zum anderen werden direkte vesikuläre Transportwege der lysosomalen Membranproteine vom Trans-Golgi-Netzwerk zu den Lysosomen beschrieben (Fujita, et al., 1999; Le Borgne et al., 1998a; Höning et al., 1996; Peters und von Figura, 1994) (siehe Abbildung 1.2).

Als Erkennungssignal der lysosomalen Membranproteine dient entweder ein Glycin-Tyrosin- oder ein Di-Leucinmotiv am zytosolischen, C-terminalen Ende des Proteins

(Letourneur und Klausner, 1992). Zu den Membranproteinen mit einem Glycin-Tyrosin-Motiv gehören LAMP-1, LAMP-2, LIMP-I, das vom Glycin-Tyrosin-Motiv abgeleitet auch als LAMP-3 bezeichnet wird, und LAP (Hunziker und Geuze, 1996; Peters et al., 1990). LIMP-II weist das Di-Leucin-Motiv auf (Ogata und Fukuda, 1994).

Der intrazelluläre Transport der lysosomalen Membranproteine vom Trans-Golgi-Netzwerk zu den Lysosomen wird durch so genannte zytosolische Adapter-Proteine-Komplexe 1 bis 3 (AP-1 bis AP-3) vermittelt (siehe Abbildung 1.2), die über die lysosomalen Erkennungssignale – Glycin-Tyrosin- und/oder Di-Leucin-Motiv – mit den lysosomalen Membranproteinen interagieren (Le Borgne und Hoflack, 1998b).

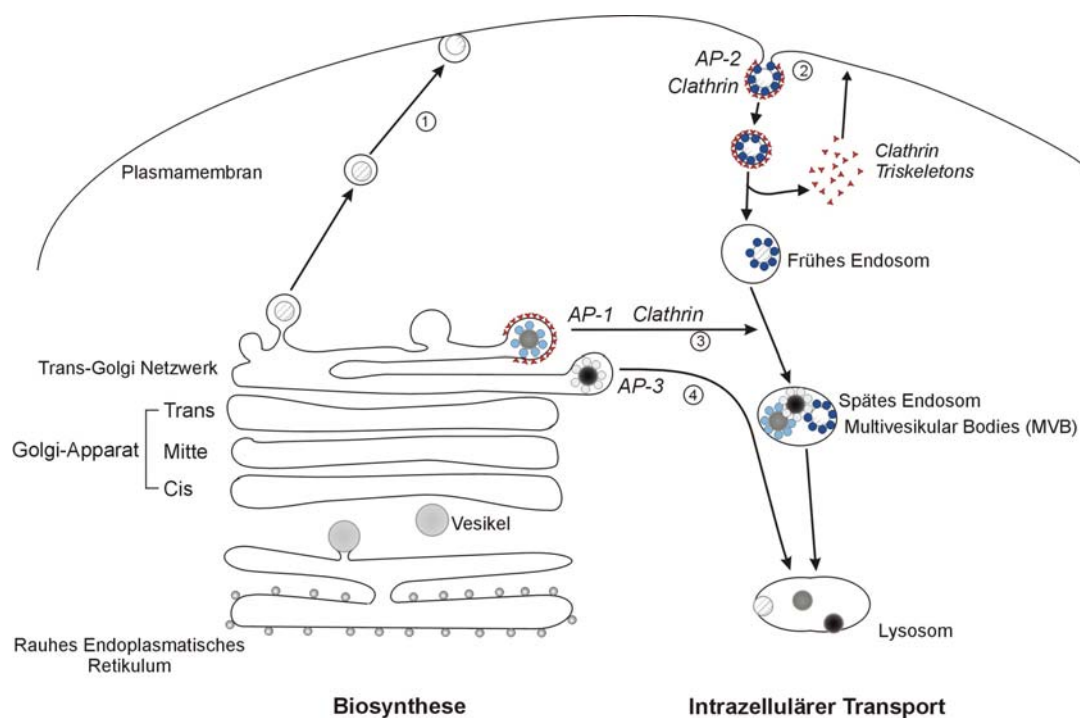


Abb. 1.2: **Modell der Biosynthese und des Transportes lysosomaler Proteine (modifiziert nach Le Borgne und Hoflack, 1998b).** Nachdem die lysosomalen Proteine im rauhen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und im Golgi-Apparat prozessiert wurden, gelangen sie über bisher drei bekannte Transportwege vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu den Lysosomen. ① Transport von Proteinen vom TGN zur Zelloberfläche. ② Endozytose dieser Proteine und über den zytosolischen Adapter-Protein-Komplex 2 (AP-2) vermittelter Transport in Clathrin umhüllten Vesikeln von der Plasmamembran über Endosomen zu den Lysosomen. ③ AP-1 vermittelt in Clathrin umhüllten Vesikeln abhängigen Transport zu den frühen Endosomen. ④ AP-3 vermittelt den Transport vom TGN (über Endosomen ?) zu den Lysosomen.

Es gilt als erwiesen, dass der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor vermittelte Transport lysosomaler Hydrolasen AP-1 vermittelt vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu den frühen Endosomen stattfindet (Kornfeld und Mellman, 1989). Die Vorläuferform der LAP wird zuerst an

die Zelloberfläche transportiert, dort „endozytiert“ und AP-2 vermittelt über die Endosomen zu den Lysosomen transportiert (Peters und von Figura, 1994). Sowohl der AP-1 als auch der AP-2 vermittelte Transport findet in Clathrin umhüllten Vesikeln statt. Unterschiedliche Erkenntnisse liegen beim intrazellulären Transport von LIMP-II und LAMP-1 vor. Höning et al. (1998) konnten zeigen, dass LIMP-II mit AP-3, nicht aber mit AP-1 und AP-2 interagiert. LAMP-1 hingegen weist eine hohe Affinität zu AP-1 und AP-2, nicht aber zu AP-3 auf (Höning et al., 1996). Die Inaktivierung des AP-3 in menschlichen Zellen führte nach Le Borgne et al. (1998a) zur selektiven Fehlleitung von LIMP-II und LAMP-1 zur Zelloberfläche, ohne den AP-1 abhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor vermittelten Transport vom Trans-Golgi-Netzwerk zu den Endosomen zu beeinflussen. Karlsson und Carlsson (1998) konnten zeigen, dass LAMP-1 und LAMP-2 und der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor in unterschiedlichen Vesikeln transportiert werden. Weitere Ergebnisse werden dahingehend gedeutet, dass AP-1 LIMP-II am Trans-Golgi-Netzwerk bindet und den Transport zu den Endosomen vermittelt. Der abschließende Transport zu den Lysosomen findet AP-3 vermittelt statt (Fujita et al., 1999). Dem widersprechen Ergebnisse von Simpson et al. (1997), die keine Kolo-kalisation des AP-3 mit endosomalen Markern nachweisen konnten. Sie gehen davon aus, dass AP-3 in einen direkten Transport vom TGN zu den Lysosomen involviert ist (Simpson et al., 1997).

1.3.1.2 Funktion der lysosomalen Membranglykoproteine

Unabhängig von der Schutzfunktion konnte den lysosomalen Membranproteinen bis vor kurzem keine spezifischen Funktionen zugewiesen werden. Bis dahin galten sie primär als Strukturproteine (Hunziker und Geuze, 1996). Mittlerweile gibt es Erkenntnisse darüber, dass LAMP-2 als Rezeptor für die selektive Aufnahme zum Abbau bestimmter zytosolischer Proteine in die lysosomale Membran eine Rolle spielt (Cuervo und Dice, 1996). Hierfür findet zuerst eine Substratbindung an die lysosomale Membran über den zytosolischen Teil von LAMP-2 statt (Cuervo und Dice, 1996). Darauf folgt der Transport des Substratproteins durch die Membran und der abschließende Abbau im Lumen der Lysosomen (Terlecky und Dice, 1993; Übersicht: Cuervo und Dice 1998) (Abbildung 1.2).

Die für den spezifischen lysosomalen Abbau bestimmten zytosolischen Proteine tragen das so genannte KFERQ-Motiv (Chiang und Dice, 1988). Eine vergleichbare Sequenz wurde bei etwa 30 % der zytosolischen Proteine nachgewiesen (Chiang und Dice, 1988). Das Hitzeschockprotein mit einem Molekulargewicht von 73 kDa (Hsc 73) bindet spezifisch Peptide mit dieser Sequenz und unterstützt die Bindung und Aufnahme des Substratpeptids in die Lysosomen (Cuervo et al., 1997; Cuervo et al., 1994; Terlecky und Dice, 1993). Es wird

davon ausgegangen, dass es sich beim zytosolischen und beim lysosomal assoziierten Hsc 73 um verschiedene Proteine handelt (Terlecky et al., 1993). Das zytosolische Hsc 73 vermittelt die Bindung an LAMP-2 und das lysosomale Hsc 73 ist zur Aufnahme des Substratproteins in die Lysosomen nötig (Cuervo und Dice, 1998). Hsc 73 verfügt über zwei KFREQ Sequenzen. Es wird postuliert, dass das luminal Hsc 73 auf dem selben Pfad ins Lumen der Lysosomen gelangt wie die zytosolischen Substratproteine (Cuervo et al., 1997).

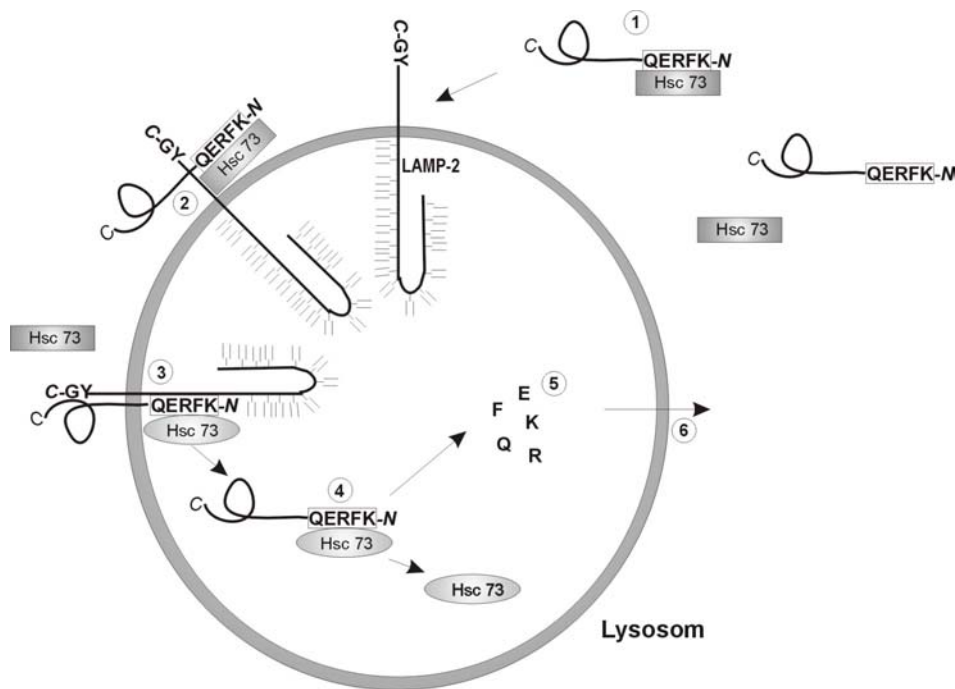


Abb. 1.3: **Modell des Chaperon vermittelten Transports zytosolischer Proteine in Lysosomen (modifiziert nach Cuervo und Dice, 1998).** ① Erkennung und Binden des Substratproteins mit der N-terminalen KFREQ-Sequenz durch das zytosolische Hitzeschockprotein 73 (Hsc 73). ② Chaperon bindet an den zytosolischen Teil von LAMP-2. ③ Transport des Substratproteins durch die lysosomale Membran. Hierfür löst sich das zytosolische Hsc 73 und luminal bindet das lysosomale Hsc 73. ④ Aufnahme des Chaperon gebundenen Substratproteins ins Lumen des Lysosoms. ⑤ Nach dem Lösen des lysosomalen Hsc 73 vom Substratprotein folgt der Abbau des Substratproteins durch lysosomale Proteinasen. ⑥ Transport der lysosomalen Abbauprodukte ins Zytosol.

LAMP-2 defiziente Mäuse weisen, verglichen mit Wildtypmäusen, ein geringeres Körpergewicht, eine geringere Körpergröße und eine höhere Mortalität auf (Tanaka et al., 2000). Die überlebenden LAMP-2 defizienten Mäuse sind fortpflanzungsfähig und haben eine normale Lebenserwartung (Tanaka et al., 2000). Im Vergleich dazu führt ein LAMP-1 Mangel zu keinerlei Auffälligkeiten (Andrejewski et al., 1999). Dies wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass es unter LAMP-1 Mangel zur vermehrten Bildung von LAMP-2 kommt, somit also eine Kompensation stattfindet (Andrejewski et al., 1999). Mäuse, die sowohl

LAMP-1, als auch LAMP-2 defizient sind, sind nicht lebensfähig. Dieser Defekt führt zum embryonalen Tod (Andrejewski et al., 1999).

In neueren Untersuchungen ist es gelungen weitere (indirekte) Erkenntnisse bezüglich der Funktion von LAMP-2 zu gewinnen. Es wird vermutet, dass LAMP-2, neben der beschriebenen Funktion als Rezeptor, an Fusionsprozessen autophagischer Vakuolen mit Endosomen/Lysosomen involviert ist (Tanaka et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass ein LAMP-2 Mangel als primärer Defekt des Danon Syndroms (englisch: Danon disease) anzusehen ist (Tanaka et al., 2000; Nishino et al., 2000). Diese Krankheit galt bisher als „lysosomale Glykogenspeicherkrankheit mit normaler Aktivität der sauren Maltase“ (Danon et al., 1981). Klinische Symptome sind eine Kardiomyopathie und eine leichte Myopathie sowie eine unterschiedlich stark ausgeprägte Verzögerung der geistigen Entwicklung (Nishino et al., 2000). Ferner kommt es zur zellulären Ansammlung autophagischer Vakuolen, die in Herz- und Muskelzellen auch Glykogen enthalten (Nishino et al., 2000). Allerdings konnte gezeigt werden, dass es nicht bei jedem Patienten mit dem Danon Syndrom zu einem Anstieg des Glykogens kommt, so dass diese Erkrankung nicht mehr, wie bisher beschrieben, zu den Glykogenspeicherkrankheiten gezählt werden sollte (Nishino et al., 2000). Es ist vielmehr das erste Beispiel einer Kardiomyo- und Myopathie, die durch den Defekt eines lysosomalen Strukturproteins, dem LAMP-2, und nicht durch ein Enzym verursacht wird (Nishino et al., 2000).

1.3.2 Transportaufgaben der lysosomalen Membran

Der Durchtritt von Stoffwechselprodukten durch die lysosomale Membran geschieht über substratspezifische Transportsysteme (Forster und Lloyd, 1988). Es sind mehr als 20 dieser lysosomalen Transporter bekannt. Zu ihnen gehören unter anderem carriervermittelte Transporter neutraler Aminosäuren (Pisoni et al., 1987; Bernar et al., 1986), Nukleoside (Pisoni et al., 1989), N-Acetylgalaktosamin (Jonas und Jobe, 1990), Glukose und anderer neutraler Hexosen (Mancini et al., 1990) sowie Schwermetallionen (Havelaar et al., 1998b). Des Weiteren wurden Eisentransporter (Tabuchi et al., 2000), Dipeptidtransporter (Zhou et al., 2000; Thamotharan et al., 1997), Oligosaccharidtransporter (Saint-Pol et al., 1999), der Transporter für Cystin (Green et al., 1990), dessen Klonierung 1998 Town et al. gelang, sowie Transporter für Monoiodtyrosin, ebenso wie Tyrosin (Anderson et al., 1990), für organische Anionen (Havelaar et al., 1999), Vitamin B₁₂ (Idriss et al., 1991), Phosphat (Pisoni, 1991), Glucuronsäure, Sialinsäure (Havelaar et al., 1998a) und andere einfach carboxylierte Monosaccharide (Havelaar et al., 1999) beschrieben. Die Klonierung des Sialinsäuretransporters, des so genannten Sialins, gelang Verheijen et al. 1999.

Das Wissen über die spezifischen Transporter rührt meistens von kinetischen Versuchen her, oder/und über Defekte des lysosomalen Transportsystems. Letzteres führt zur Anhäufung von Abbauprodukten in den Lysosomen. Von der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Transporter konnten bisher lediglich zwei kloniert werden, der Transporter für Cystin (Town et al., 1998) und der Sialinsäuretransporter (Verheijen et al., 1999).

1.3.3 Biochemie und Pathophysiologie ausgewählter Transporter der lysosomalen Membran

Die Familie der lysosomalen Membranproteine und Transporter wird immer größer. Zu den eindeutig identifizierten lysosomalen Transportern zählen der Sialinsäuretransporter (Verheijen et al., 1999) und der Cystintransporter (Town et al., 1998). Es handelt sich hierbei um die einzigen lysosomalen Membranproteine, deren Funktion und Struktur bekannt sind. Bei der lysosomalen H^+ -ATPase (Arai et al., 1993), dem CLN3-Protein (The International Batten Disease Consortium, 1995), auch bekannt unter dem Namen Battenin (Golabek et al., 1999), der Acetyl-Coenzym A: α -Glucosaminid N-Acetyltransferase (Bame und Rome, 1986), dem Vitamin B₁₂-Transporter und dem Niemann-Pick Typ C-1 Protein (Carstea et al., 1997) sind die cDNA, die Struktur und/oder die Funktion bekannt.

1.3.3.1 Cystinosin

Das Cystinosin ist ein pH-abhängiger Cystintransporter (Kalatzis et al., 2001). Das Protein hat ein Molekulargewicht von etwa 80 kDa (Cherqui et al., 2001), verfügt über sieben potentielle Transmembrandomänen und ebenso viele potentielle N-Glykosylierungsstellen (Town et al., 1998). Das aus der Peptidsequenz errechnete Molekulargewicht liegt bei 42 kDa (Town et al., 1998), was, verglichen mit dem apparenten Molekulargewicht, auf ein stark glykosyliertes Transmembranprotein schließen lässt. Das Cystinosin besitzt neben dem hinreichend bekannten Gly-Tyr-Motiv als lysosomalem Erkennungssignal im zytosolischen C-Terminus, ein weiteres – bisher unbekanntes – lysosomales Erkennungssignal, das in einer der zytosolischen Schleifen lokalisiert ist (Cherqui et al., 2001). Es handelt sich dabei um das Tyr-Phe-Pro-Gln-Ala-Motiv (YFPQA-Motiv) (Cherqui et al., 2001).

Ein Defekt des Cystinosins führt zur Cystinose, einer lysosomalen, autosomal rezessiven Speicherkrankheit. Hierbei kommt es zur intralysosomalen Anhäufung des zum lysosomalen Export bestimmten freien Cystins. Es wird zwischen drei klinischen Gruppen differenziert, die sich durch den Zeitpunkt der Erstmanifestation und ihrem klinischen Verlauf unterscheiden (Übersicht: Clarke, 1997). Bei der klassischen Form, die in 95 % der Fälle auftritt, handelt es

sich um die nephropathische Cystinose, die in den ersten beiden Lebensjahren auftritt (Mancini et al., 2000; Clarke, 1997). Es kommt zur Auskristallisation und Ablagerung von Cystin in den Nieren, welche eine Schädigung der Funktion des proximalen Tubulus verursachen, die zu einer verminderten Reabsorption kleiner Moleküle (Mancini et al., 2000) und daraus folgend zu einer Elektrolytstörung führt (Baum, 1998). Unbehandelt führt diese Erkrankung im Alter von 7 bis 8 Jahren zum Nierenversagen (Clarke, 1997).

1.3.3.2 Sialinsäuretransporter

Der als Sialin bezeichnete lysosomale Sialinsäuretransporter wurde 1999 von Verheijen et al. kloniert. Beim Sialin handelt es sich aufgrund seiner zwölf Transmembrandomänen mit zytosolischem N- und C-Terminus um ein Typ III Membranprotein (Verheijen et al., 1999). Das Molekulargewicht des Transmembranproteins beträgt 57 kDa (Havelaar et al., 1998a). Die Behandlung mit der Endoglykosidase F und der Peptid N-Glycosidase F zeigte kaum eine Änderung der Größe (Havelaar et al., 1998a). Dies deutet darauf hin, dass das Sialin trotz seiner sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen kaum glykosyliert ist. Der Sialinsäuretransporter besitzt im C-Terminus weder das Glycin-Tyrosin- noch das Di-Leucin-Motiv (Verheijen et al., 1999). Dieses nicht vorhandene lysosomale Erkennungssignal führen Verheijen et al. (1999) darauf zurück, dass der Transporter nicht ausschließlich in der lysosomalen Membran lokalisiert ist.

Die Reinigung des lysosomalen Sialinsäuretransporters aus Rattenleber führte zu der Beobachtung, dass hiermit nicht nur saure Monosaccharide (N-Acetylneuraminsäure und N-Glykolyneuraminsäure), sondern ebenso aliphatische Mono- und Dicarboxylate (z.B. Pyruvat und Fumarat) transportiert werden (Havelaar et al., 1998a).

Ein Defekt des Transporters führt zu den so genannten Sialinsäurespeicherkrankheiten, mit einer folgenschweren Verlaufsform, der infantilen Sialinsäurespeicherkrankheit (ISSD: infantile sialic acid storage disease), und der milden Verlaufsform, der „Salla Disease“ (SD), (Mancini et al., 2000). Der Name Salla leitet sich von einer im Norden Finnlands gelegenen gleichnamigen Region ab, in der diese Erkrankung entdeckt wurde und gehäuft auftritt (Mancini et al., 2000; Aula et al., 1979). Diese phänotypisch unterschiedlichen lysosomalen Speicherkrankheiten sind biochemisch charakterisiert durch die Ansammlung der Sialinsäure im lysosomalen Kompartiment und der exzessiven Ausscheidung der Sialinsäure mit dem Urin (Mancini et al., 2000; Havelaar et al., 1998a).

Die Salla Disease ist gekennzeichnet durch ein variables Ausmaß der Neurodegeneration und durch Bewegungsstörungen (Aula et al., 2000). Die Erstmanifestation dieses Phänotyps

ist im Alter von etwa einem Jahr, wobei die Patienten eine normale Lebenserwartung haben (Aula et al., 2000). Die im Gegensatz dazu tödlich verlaufende infantile Sialinsäurespeicherkrankheit geht mit einer verzögerten psychomotorischen Entwicklung, Gedeihstörungen sowie Milz- und Lebervergrößerung einher (Aula et al., 2000).

1.3.3.3 Lysosomale Protonenpumpe (V-Typ H^+ -ATPase)

Bei der von Arai et al. (1993) aus Rattenleber gereinigten und charakterisierten lysosomalen Protonenpumpe handelt es sich um eine anionensensitive H^+ -ATPase vom V-Typ. Zum V-Typ gehören Protonenpumpen, die bei vakuolären Organellen zu detektieren sind (Arai et al., 1993). Das die lysosomale Membran durchspannende Enzym besteht aus dreizehn Untereinheiten von 16 bis 110 kDa (Arai et al., 1993).

Ein Defekt der Protonenpumpe und das daraus folgende Fehlen der „Ansäuerung“ der Lysosomen ist wahrscheinlich nicht mit dem Leben vereinbar (Winchester, 2001).

1.3.3.4 CLN3-Protein

Das Peptidgerüst des CLN3-Proteins hat ein Molekulargewicht von etwa 43 kDa (Järvelä et al., 1998) und das der reifen, glykosylierten Form von 66 kDa und 100 kDa (Golabek et al., 1999). Das auch als Battenin bezeichnete CLN3-Protein besitzt vier potentielle N-Glykosylierungs- und zwei potentielle Glykosaminoglykanbindungsstellen (The International Batten Disease Consortium, 1995). Die computergestützte Analyse der Proteinsequenz lässt vermuten, dass es sich beim Battenin um ein Membranprotein mit sechs Transmembrandomänen handelt (Janes et al., 1996). Das CLN3 Polypeptid weist im C-terminalen Teil das lysosomale Di-Leucin-Erkennungsmotiv auf (The International Batten Disease Consortium, 1995). Golabek et al. (1999) konnten zeigen, dass es sich beim Battenin um ein lysosomales Membranprotein handelt.

Ein Defekt des *CLN3*-Gens führt zu der juvenilen neuronalen Ceroid Lipofuscinose (JNCL), die auch unter dem Namen Batten-Krankheit bekannt ist (Zhang, 2000; The International Batten Disease Consortium, 1995). Die neuronalen Ceroid Lipofuscinosen (NCL) bilden eine acht Formen umfassende Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die anfänglich nach den klinischen Symptomen und dem Alter der Erstmanifestation klassifiziert wurden (Mole, 1999). Das charakteristische und namensgebende Symptom ist die Ansammlung autofluoreszierender Lipopigmente (Ceroid und Lipofuscin). Die heutige Einteilung der Erkrankungen erfolgt aufgrund von Mutationen der Gene *CLN1* bis *CLN8* (Mole, 1999). Bei den neuronalen Ceroid Lipofuscinosen handelt es sich um die häufigste neurodegenerative

Erkrankung im Kindesalter. Die drei klassischen im Kindesalter auftretenden Formen, die infantile (INCL), die späte infantile (LINCL) und die juvenile neuronale Ceroid Lipofuscinosen machen etwa 90 % der Erkrankungen aus (Zhong, 2000). Die juvenile neuronale Ceroid Lipofuscinose, der Defekt des lysosomalen CLN3-Proteins, gehört zur häufigsten Form der neuronalen Ceroid Lipofuscinosen (Golabek et al., 1999). Sie geht mit Sehstörungen, Epilepsie und fortschreitendem geistigen Verfall einher und führt zum vorzeitigen Tod im Alter von etwa 25 Jahren (Järvelä et al., 1998).

1.3.3.5 Acetyl-Coenzym A: α -Glucosaminid N-Acetyltransferase

Ein weiteres Protein der lysosomalen Membran ist die Acetyl-Coenzym A: α -Glucosaminid N-Acetyltransferase (N-Acetyltransferase) (E.C. 2.3.1.3), bisher das einzige Beispiel eines „synthetisch“ aktiven lysosomalen Enzyms (persönliche Mitteilung: A. Hasilik). Sie ist essentiell für den lysosomalen Katabolismus des Heparansulfats und des Heparins. Die N-Acetyltransferase transferiert die Acetylgruppe des Coenzym A auf terminale Glucosaminreste der in Lysosomen abzubauenden Heparansulfatketten und des Heparins (Meikle et al., 1995; Bame und Rome, 1986). Das Enzym überträgt die Acetyl-Gruppen von der zytosolischen zur luminalen Seite der lysosomalen Membran (Bame und Rome, 1986).

Ein Defekt dieses Enzyms führt zum Sanfilippo Syndrom Typ C, einer Typ III C Mucopolysaccharidose (Klein et al., 1978). Die klinischen Symptome dieser autosomal rezessiven Erkrankung sind eine fortschreitende geistige Retardierung, Verhaltensauffälligkeiten und eine leichte Deformierungen des Skeletts (Meikle et al., 1995). Das Sanfilippo Syndrom Typ C führt meist am Ende des zweiten Lebensjahrzehnts zum Tod (Meikle et al., 1995). Als biochemische Merkmale dieser Typ III C Mucopolysaccharidose wird die intralysosomale Speicherung von Heparin und Heparansulfatfragmenten in allen Organen ebenso wie eine exzessive Ausscheidung dieser Fragmente mit dem Urin beschrieben (Meikle et al., 1995).

1.3.3.6 Vitamin B₁₂ -Transporter

Die intrazelluläre Aufnahme des an Transcobalamin II gebundenen Vitamin B₁₂ (Cobalamin-Transcobalamin II - Komplex) erfolgt über eine Rezeptor vermittelte Endozytose an der Zelloberfläche (Vassiliadis et al., 1991). Nachdem dieser Komplex in die Zelle aufgenommen wurde, erfolgt sein vesikulärer Transport zu den Lysosomen. Es folgt die intralysosomale Spaltung des Cobalamins vom Transcobalamin II und der Abbau des Proteins durch lysosomale Proteinasen (Youngdahl-Turner et al., 1978). Das frei gewordene Vitamin B₁₂ wird über einen spezifischen, magnesium- und pH-abhängigen, lysosomalen Transporter wieder ins Zytosol abgegeben (Idriss und Jonas, 1991).

Die Schädigung dieses lysosomalen Transporters führt zu der sehr selten vorkommenden Cobalamin F Krankheit (cbl F Krankheit). Hierbei kommt es zur Ansammlung des freien Vitamin B₁₂ in den Lysosomen (Shih et al., 1989; Watkins et al., 1986).

1.3.3.7 Niemann-Pick Typ C-1 Protein

Carstea et al. ist es 1997 gelungen das *NPC1* Gen zu klonieren. Die Analyse der cDNA lässt vermuten, dass das Niemann-Pick Typ C-1 Protein (NPC-1) mit seinen 1278 Aminosäuren ein geschätztes Molekulargewicht von 142 kDa hat (Carstea et al., 1997). Die Struktur weist 13 bis 16 potentielle Transmembrandomänen und 14 potentielle N-Glykosylierungsstellen auf (Carstea et al., 1997). Das C-terminale Di-Leucin-Motiv, eines der lysosomalen Erkennungssignale, lässt darauf schließen, dass es sich bei dem Niemann-Pick Typ C-1 Protein um ein lysosomales Membranprotein handelt.

Ein Defekt dieses Proteins führt zur Niemann-Pick Typ C Krankheit (NPC) (Carstea et al., 1997), einer weiteren lysosomalen Speicherkrankheit, deren klinisches Bild bekannt ist, über deren biochemische Ursache aber wenig Informationen vorliegen. Es ist eine seltene, tödlich verlaufende, autosomal rezessive lysosomale Lipidspeicherkrankheit, die zu einer Leber- und Milzvergrößerung und zu fortschreitendem Verfall des zentralen Nervensystems führt (Carstea et al., 1997; Vanier et al., 1991). Die biochemischen Merkmale liegen in einer Anhäufung nicht veresterten Cholesterols, Spingomyelins und von Glycolipiden in den Lysosomen (Vanier et al., 1996; Pentchev et al., 1986b; Pentchev et al., 1984; Vanier, 1983). Das Cholesterol hat einen exogenen Ursprung und stammt vom Low-Density-Lipoprotein (LDL) (Vanier, 1991; Pentchev et al., 1986a/b; Pentchev et al., 1984), welches an der Zelloberfläche an den LDL-Rezeptor gebunden, endozytiert und zu den Lysosomen transportiert wird (Brown und Goldstein, 1986). In diesen kommt es zur Freisetzung des Cholesterols (Brown und Goldstein, 1986). Die neurologische Erstmanifestation der Niemann-Pick Typ C Krankheit geht von der frühen Kindheit bis hin zum Erwachsenen (Vanier et al., 1991). Die meisten Fälle treten im Alter von 4 bis 12 Jahren auf (Vanier et al., 1991), etwa 5 % erst im Erwachsenenalter (Vanier, 1997). Der typische Patient hatte eine Gelbsucht im Neugeborenenalter, eine milde Form der Leber- und Milzvergrößerung in der frühen Kindheit und einen fortschreitenden Verfall des zentralen Nervensystems, gekennzeichnet durch Störung der Bewegungskoordination, fehlerhaften Spannungszustand von Muskeln und Gefäßen, Augenmuskellähmung und geistigem Verfall sowie Sprachstörungen, die erst im Erwachsenenalter auftreten (Pentchev et al., 1994).

In Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass der bei der Niemann-Pick Typ C Krankheit vorliegende Defekt der Ausschleusung des Cholesterols mit der verminderten Synthese zweier „feed-back“ Komponenten der Cholesterolhomöostase, der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Reduktase (HMG-R) und dem Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor (LDL-Rezeptor), einhergeht (Liscum und Faust, 1987; Pentchev et al., 1986b).

2 Ziele der Arbeit

Der Kenntnisstand im Bereich von Struktur und Funktion der lysosomalen Membran und der lysosomalen Membranproteine wurde beschrieben. Die lysosomale Membran erfüllt vielfältige lebensnotwendige Aufgaben. Hervorzuheben ist der spezifische Transport niedermolekularer lysosomaler Abbauprodukte sowie der Schutz der Zelle vor autolytischem Verdau. Bisher konnten nur wenige lysosomale Transporter und Membranproteine kloniert beziehungsweise sequenziert werden. Derzeit verhindern grundlegende technische Probleme Fortschritte auf diesem Gebiet: Die Herstellung und das Solubilisieren größerer Mengen von Membranproteinen ist sehr schwierig.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, präparative Mengen gereinigter lysosomaler Membranproteine zu isolieren, in Lösung zu bekommen und zweidimensional aufzutrennen (Abb. 2.1 ①). Hierdurch sollen die Grundlagen zur Sequenzierung oder massenspektrometrischen Analyse des Proteoms der lysosomalen Membranproteine geschaffen werden.

Die Basis hierfür bietet die in der Arbeitsgruppe Hasilik – unter anderem – von Diettrich (1996) durchgeführte Arbeit. Ihm ist es gelungen aus humaner Plazenta isolierte lysosomale Membranproteine aufzureinigen und analytische Mengen dieser Proteine zweidimensional aufzutrennen. Die zweidimensionale SDS-Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese) gilt nach wie vor als die Methode der Wahl zur Auftrennung heterogener Proteingemische (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Im weiteren Verlauf der Arbeit soll eine Charakterisierung des Proteoms der lysosomalen Membran durchgeführt werden (Abb. 2.1 ②). In einem ersten Schritt wird mit Hilfe einer Natriumcarbonat-Behandlung die Klassifizierung der Membranproteine bezüglich ihrer ionischen Wechselwirkung durchgeführt werden (nach Fujiki et al., 1982a). Die auf diese Weise behandelten lysosomalen Membranproteine sollen erstmals zweidimensional dargestellt werden. Es wird erwartet, dass es hierdurch gelingt integrale von peripheren lysosomalen Membranproteinen zu unterscheiden.

Bei allen bisher identifizierten lysosomalen Membranproteinen handelt es sich um Glykoproteine (Hunziker und Geuze, 1996). Der Rückschluss, dass es sich folglich bei allen lysosomalen Membranproteinen um Glykoproteine handelt (Hunziker und Geuze, 1996; Fukuda, 1991; Storrie, 1988) ist ein Tatbestand, den es – nach wie vor – zu beweisen gilt (Storrie, 1988). Hierzu sollen immunoaffinitätsgereinigte lysosomale Membranproteine mit Peptid N-Glycosidase F und/oder Neuraminidase behandelt und zweidimensional dargestellt werden.

Neben der beschriebenen Charakterisierung des Proteoms der lysosomalen Membranproteine sollen Untersuchungen zum Niemann-Pick Typ C-1 Protein durchgeführt werden. Ein Defekt dieses Proteins führt zur Speicherung von freiem Cholesterin in den Lysosomen. Es wird vermutet, dass es sich bei diesem 1997 von Carstea et al. klonierten Protein um ein lysosomales Membranprotein handelt.

Das Niemann-Pick Typ C-1 Protein soll mit Hilfe eines von S. Patel zur Verfügung gestellten Antikörpers erstmals in aus humaner Plazenta isolierten Lysosomen nachgewiesen werden (Abb. 2.1 ③). Sofern dieser Nachweis gelingt, soll die Verteilung des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins im lysosomalen Kompartiment im Bezug auf lysosomale Markerproteine untersucht und weiterführende Versuche zur Charakterisierung des Proteins durchgeführt werden.

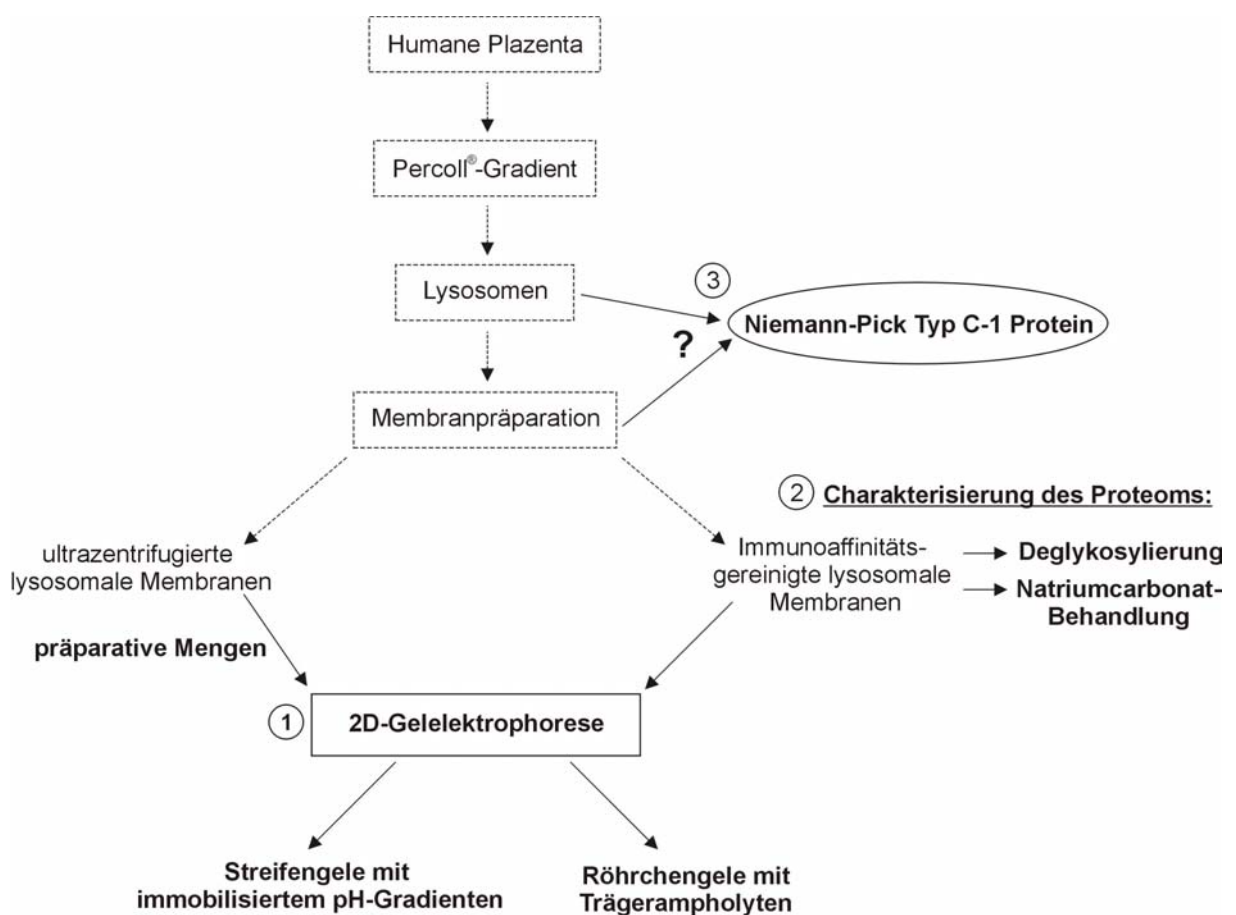


Abb. 2.1: **Schematische Darstellung des geplanten Projektes.** Die fett gedruckten Bereiche heben die geplanten Arbeiten zur Untersuchung des Proteoms der lysosomalen Membranproteine (①,②) sowie zum Nachweis des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins hervor (③). Die restlichen Teile der Graphik stellen den Kenntnisstand zum Beginn der vorliegenden Arbeit dar (eigene Darstellung).

3 Material und Methoden

3.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „pro analysi“ (p.a.) und wurden – sofern nicht anders angegeben – von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), ICN (Meckenheim), Merck (Darmstadt), Riedel-De Haën (Hannover), Roth (Karlsruhe), SERVA (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Beim verwendeten Wasser handelte es sich ausschließlich um zweifach deionisiertes und sterilfiltriertes Wasser (Milli Q UF-Anlage der Firma Millipore, Erkrath).

3.1.1 Antikörper

Antiseren

Verwendet wurde polyklonales Kaninchen Antiserum gegen ein Peptid (NKA^KSCATEERYKGTERER) der C-terminalen Domäne (Aminosäuren 1256-1274) des humanen Niemann-Pick Typ C-1 Proteins (NPC-1 C). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Shutish Patel, M.D., Departement of Veterans Affairs, Medical Center, Newington, Vereinigte Staaten von Amerika.

Monoklonaler beziehungsweise polyklonaler affinitätsgereinigter Antikörper

Des Weiteren wurde ein von der Arbeitsgruppe Hasilik an der Universität Münster hergestellter monoklonaler Mausantikörper (2D5) gegen das humane lysosomal assoziierte Membranprotein 2 (LAMP-2) und ein affinitätsgereinigter polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes Cathepsin D (α -CD) verwendet.

Antikörperkonjugate

Mit alkalischer Phosphatase konjugiert:

Ziege-gegen-Maus IgG (H+L) (G α M-aP) (BioRad, München),

Ziege-gegen-Kaninchen IgG (H+L) (G α R-aP) (BioRad, München).

Mit Meerrettichperoxidase konjugiert:

Ziege-gegen-Maus IgG (H+L) (G α M-POD) (BioRad, München),

Ziege-gegen-Kaninchen IgG (H+L) (G α R-POD) (BioRad, München).

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung und affinitätschromatographische Reinigung des monoklonalen 2D5-Antikörpers

Der von Radons (1992) beschriebene Klon mit der Bezeichnung 2D5 wurde in 25 cm² Kulturflaschen in RPMI-1640-Medium (Gibco-BRL, Eggenstein) unter 5 % Kohlendioxid-atmosphäre bei 37 °C kultiviert.

Die Kulturüberstände der 2D5-Hybridomazellen in 100 mM Natrium-Acetat pH 5.2 wurden mittels einer 5 mal 1 cm großen Protein G-Sepharose-4B-Säule (Pharmacia, Freiburg), die in 0.1 M Natrium-Acetat equilibriert (Equilibrierungspuffer) worden war, bei 4 °C affinitätschromatographisch getrennt.

Mit einer Flussrate von 1 bis 2 mL pro Minute wurden 80 mL Kulturüberstände auf die Säule aufgetragen und mit fünf Mal 5 mL Equilibrierungspuffer gewaschen. Die Antikörper wurden allmählich 5 mal mit je 5 mL 0.1 M Natrium-Acetat eines sinkenden pH-Gradienten mit pH-Stufen von 0.3, beginnend bei pH 4.5 (pH 4.5 bis pH 3.3), eluiert. Die Elution wurde mit einem sechsten Schritt eines 0.1 M Natrium-Acetat-Puffers pH 3.6 beendet. Bei den fraktioniert gesammelten Eluaten wurde mit 0.5 M Natronlauge ein pH-Wert von 7.0 eingestellt. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde spektralphotometrisch bei 280 nm bestimmt.

Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereinigt (Endvolumen 15 mL) und baldmöglichst in einer Ultrahülse UH 100/25 (Schleicher & Schüll, Dassel) bei 4 °C auf 1 bis 2 mL eingeeengt. Der Ankonzentrierung der monoklonalen Antikörper schloss sich eine 36-stündige Dialyse gegen 150 mM Natriumchlorid, 10 mM Natriumphosphat pH 7.4 (PBS) mit viermaligem Pufferwechsel an. Die Antikörper gegen das 2D5-Antigen wurden entweder in 600 µg Aliquots oder in 50 % [v/v] Glycerin bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Präparation von 2D5-C1Z-Antikörperkonjugaten

Die Herstellung der Eupergit-C1Z-Antikörperkonjugate erfolgte in Anlehnung an Grässel et al. (1989), indem 200 µg Eupergit C1Z (Röhm Pharma, Weiterstadt) mit 600 µg 2D5-Antikörper in 0.5 mL Kalium-Phosphat-Puffer pH 7.5 aufgenommen wurde. Dieser Ansatz wurde nach kurzer Ultraschallbehandlung 2 bis 3 Tage bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden 50 µL 8 M Ethanolamin pH 8.0 zur Blockierung der noch unbesetzten Bindungsstellen hinzugegeben und die Inkubation für weitere 4 Stunden

fortgesetzt. Das Immunadsorbens wurde vier Mal mit 800 µL phosphatgepufferter Natriumchloridlösung pH 7.4 (PBS: 150 mM Natriumchlorid, 10 mM Natriumphosphat pH 7.4) gewaschen und in einem Endvolumen von 1.2 mL in 50 % [v/v] Glycerin in 0.02 % [w/v] Natriumazid, 0.2 % [w/v] Rinderserumalbumin, 150 mM Natriumchlorid, 10 mM Natriumphosphat pH 7.4 bei -70°C gelagert.

3.2.3 Isolierung lysosomaler Membranproteine aus humaner Plazenta

Die Isolierung der Lysosomen aus humaner Plazenta wurde nach Diettrich et al. (1996) durchgeführt. Die frischen, humanen Plazenten stammten aus Kliniken der näheren Umgebung und wurden sofort bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gekühlt.

Sämtliche im Folgenden beschriebene Aufarbeitungsschritte erfolgten unsteril und wurden mit eisgekühlten Puffern und Geräten durchgeführt. Die Zentrifugation erfolgte stets bei 4 °C und ungebremstem Auslauf des Rotors.

3.2.3.1 Isolierung der Lysosomen

Homogenisierungspuffer: 250 mM Saccharose
 10 mM Essigsäure
 10 mM Triethanolamin
 10 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

65 % [w/v] Saccharose in Homogenisierungspuffer

Percoll® der Dichte 1.075 Homogenisierungspuffer:

50 mL: 18.87 g Percoll® (Dichte 1.13)
 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in
 250 mM Saccharose
 10 mM Essigsäure
 10 mM Triethanolamin
 10 mM EDTA

Percoll® der Dichte 1.095 in Homogenisierungspuffer:

50 mL: 27.56 g Percoll® (Dichte 1.13) in
 250 mM Saccharose
 10 mM Essigsäure
 10 mM Triethanolamin
 10 mM EDTA

Die folgenden Arbeitsschritte wurden im Kühlraum (4 °C) durchgeführt:

Große Blutgefäße wurden von der Plazenta entfernt, das Parenchymgewebe mit einem scharfen Messer von der Basalplatte abgeschabt, drei Mal mit einer 0.9 % [w/v] Natriumchloridlösung gewaschen, von Blutgerinnseln befreit, in einem haushaltsüblichen Fleischwolf zerkleinert, mit 250 mL einfach konzentriertem Homogenisierungspuffer gemischt und 4 mal 5 Sekunden auf Eis mit einem Ultra-Turrax T 50 (Jahnke & Kunkel GmbH, Staufen im Breisgau) homogenisiert. Das Homogenat wurde auf vorgekühlte GSA-Zentrifugenbecher (Sorvall®, Bad Homburg) verteilt und 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute ($2\,603 \cdot g_{\max}$) im GSA-Rotor zentrifugiert. Der entstandene postnukleare Überstand wurde dekantiert, auf vorgekühlte SS-34 Zentrifugenröhrchen (Sorvall®, Bad Homburg) verteilt und mit 2.5 mL der Percoll®-Lösung der Dichte 1.075 unterschichtet. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 20 000 Umdrehungen pro Minute ($47\,807 \cdot g_{\max}$) im SS-34 Rotor (Sorvall®, Bad Homburg) wurden die Überstände verworfen, die lockeren Niederschläge vereinigt und mit Hilfe eines Glas/Teflon Potters homogenisiert. Dieses Organellenkonzentrat blieb unverdünnt und ergab ein Gesamtvolumen von 40 mL.

3.2.3.2 Subzelluläre Fraktionierung

Die subzelluläre Fraktionierung des Organellenkonzentrats erfolgte über eine kontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe von Polyvinylpyrrolidon beschichteten Silicapartikeln (Percoll®) nach Wolff und Pertoft (1972) wie von Rome et al. (1979) beschrieben. Der Stufengradient wurde in 33 mL ULTRACRIMP™-Röhrchen (Sorvall®, Bad Homburg) wie folgt hergestellt:

Vier Zentrifugenröhrchen wurden mit je 3 mL 65 % [w/v] Saccharose beschickt. Diese Lösung wurde mit 8 mL Percoll® in Homogenisierungspuffer (Dichte 1.095) und anschließend mit 14 mL Percoll® in Homogenisierungspuffer (Dichte 1.075) überschichtet. Hierauf folgte abschließend 10 mL des Organellenkonzentrats. Nach 30-minütiger Zentrifugation in einem TV-860 Rotor (Sorvall®, Bad Homburg) bei 21 000 Umdrehungen pro Minute ($44\,076 \cdot g_{\max}$) wurden 16 Fraktionen mit einem Volumen von 2 mL vom Boden des Gradienten gesammelt, indem von oben mittels einer speziellen Verdrängungsapparatur Paraffinöl vorsichtig in das Röhrchen gepumpt wurde.

Erfahrungsgemäß kamen in den Fraktionen 2 bis 5 ein Drittel der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität vor. Diese Fraktionen wurden vereinigt (Endvolumen 32 mL) und in flüssigem Stickstoff tropfenweise schockgefroren. Die so behandelte Suspension der schweren

Lysosomen wird im Folgenden als dichter Pool bezeichnet. Ihre Lagerung erfolgte bei -80 °C, die der restlichen Fraktionen bei -20 °C.

Von Aliquots der einzelnen Fraktionen wurde routinemäßig die Aktivität der β -Hexosaminidase und der sauren β -Glucosidase bestimmt sowie eine Proteinbestimmung durchgeführt.

3.2.3.3 Herstellung lysosomaler Membranen durch Ultrazentrifugation

Auf die Angabe von entsprechenden Volumina wurde verzichtet, da diese Methode für den Einsatz von 100 μ L bis hin zu 20 mL des dichten Pools geeignet ist. Die verwendeten Reaktionsgefäße und Rotoren sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1: **Zur Herstellung von ultrazentrifugierten lysosomalen Membranen verwendete Zentrifugenbecher und Rotoren bei unterschiedlichen Probenvolumina.**

dichter Pool	Zentrifugenbecher	Rotor
0.1 bis 0.6 mL	1.5 mL Reaktionsgefäß	60 Ti mit entsprechenden Einsätzen
1.0 bis 4.0 mL	T-1270 Röhrchen	T-1270 (Sorvall®, Bad Homburg)
5.0 bis 20.0 mL	60 Ti-Röhrchen	60 Ti

Nach Auftauen des dichten Pools wurden die Proteinaseinhibitoren (Iodacetamid: SERVA, Heidelberg; Leupeptin: Boehringer, Mannheim; Pepstatin A: Sigma, Deisenhofen; Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF): SERVA, Heidelberg; Z-Phe-Phe-diazo-methylketon (ZFF): BACHEM, Heidelberg) mit der in Tabelle 3.2 beschriebenen Endkonzentration zugesetzt.

Tab. 3.2: **Liste der eingesetzten Proteinaseinhibitoren, deren Stammlösung und die verwendete Endkonzentration.**

Proteinaseinhibitor	Stammlösung	Endkonzentration
Iodacetamid in Wasser	0.5 M	0.5 mM
Leupeptin in Wasser	20 mM	0.01 mM
Pepstatin A in DMSO	1 mM	0.001 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid in Isopropanol	0.2 M	1.0 mM
Z-Phe-Phe-diazomethylketon in DMSO	1 mM	0.001 mM

Anschließend wurde die Suspension für 10 Sekunden in einem mit Eis vorgekühlten Ultraschallbad behandelt und mit 9 Volumina 4 °C kaltem 10 mM Tris/HCl pH 7.4 verdünnt. Nach dem Befüllen der entsprechend vorgekühlten Reaktionsgefäße wurde in einer Ultrazentrifuge (OTD-C+, Sorvall®, Bad Homburg) 2 Stunden bei 50 000 Umdrehungen pro

3.2.3.4 Herstellung von immunoaffinitätsgereinigten Membranen nach Diettrich et al. (1996)

Zur Präparation immunoaffinitätsgereinigter Membranen wurden 0.5 mL des dichten Pools oder einzelner Fraktionen des Percoll®-Gradienten mit den Proteinaseinhibitoren Iodacetamid, Leupeptin, Pepstatin A, Phenylmethylsulfonylfluorid und Z-Phe-Phe-diazomethylketon gemischt (Endkonzentration siehe 3.2.2). Zu diesem Ansatz wurden 50 µL einer 2D5-C1Z-Suspension pipettiert, 5 Sekunden im mit Eis vorgekühlten Ultraschallbad behandelt und für 4 oder 20 Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Nach Zugabe von 0.5 mL kaltem (4 °C) TBS und anschließendem Mischen wurde 30 Sekunden bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$), 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das 2D5-C1Z-Pellet mit 1.0 mL kaltem (4 °C) TBS gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (siehe oben) wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Saccharoselösungen:

- 18 % [w/w] Saccharose in 20 mM Natriumphosphat pH 7.5
- 30 % [w/w] Saccharose in 20 mM Natriumphosphat pH 7.5
- 47 % [w/w] Saccharose in 20 mM Natriumphosphat pH 7.5

24

Glaskapillare wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe der Saccharose-Gradient präpariert. Die Lösung des Gradienten reichte bis 1.4 cm unterhalb des Randes des Zentrifugenröhrchens.

Nach der Aktivitätsbestimmung der β -Hexosaminidase (siehe 3.2.5.1) der einzelnen Fraktionen des unter 3.2.3 beschriebenen Percoll[®]-Gradienten wurde je 1 mL der beiden Fraktionen vor dem zweiten (leichten) β -Hexosaminidase-Peak vereinigt. Diese Suspension wurde auf Eis gelagert, mit 0.1 μ L 20 mM Leupeptin, 20 μ L 1 mM Pepstatin A und 10 μ L Phenylmethylsulfonylfluorid gemischt und auf 50 % [w/w] Saccharose gebracht. Von dieser Probe wurden 1.5 mL unter den Saccharose-Gradienten geschichtet. Es schloss sich eine 18-stündige Zentrifugation bei 4 °C und 36 000 Umdrehungen pro Minute ($233\,062 \cdot g_{\max}$) mit ungebremstem Auslauf des TH-641 Rotors (Sorvall[®], Bad Homburg) an.

Das Fraktionieren des Gradienten erfolgte mit Hilfe einer Auto-Densiflow-Apparatur (Eigenbau einer Institutswerkstatt der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster) mit einer Pumpgeschwindigkeit von 2 mL pro Minute. Es wurden 12 Fraktionen mit einem Volumen von 1 mL gesammelt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

3.2.5 Enzymaktivitätstests

3.2.5.1 Bestimmung der β -Hexosaminidaseaktivität nach von Figura (1977)

Als Substrat für die Bestimmung der β -Hexosaminidaseaktivität wurde das *p*-Nitrophenyl-2-acetamid-2-desoxy- β -D-Glucopyranosid (Sigma, Deisenhofen) eingesetzt.

Substratpuffer: 100 mM Zitronensäure
0.2 % [w/v] Rinderserumalbumin¹
0.2 % [v/v] Triton X-100 (SERVA, Heidelberg)
0.04 % [w/v] Natriumazid
Mit Natronlauge wird der pH auf 4.6 eingestellt.

Substrat: 10 mM *p*-Nitrophenyl-2-acetamid-2-desoxy- β -D-Glucopyranosid in Substratpuffer

Stopplösung: 0.4 M Glycin/ NaOH pH 10.4

Der Enzymtest wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Von den mit 0.9 % [w/v] Natriumchlorid verdünnten Proben (dichter Pool: 1:100 bis 1:400, ultrazentrifugierte Membranen: 1:200 bis 1:400) wurden 25 μ L eingesetzt, mit dem gleichen Volumen Substrat gemischt und für 30 bis 60 Minuten bei 37 °C inkubiert.

¹ Fraktion V (SERVA, Heidelberg) (Bestellnummer: 11930)

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 µL Stopplösung beendet und die Absorption des entstandenen *p*-Nitrophenol bei 405 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät (Dynatech, Denkendorf) gemessen. Die Schichtdicke der Lösung betrug 1 cm. Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Gesamtvolumen} \times \text{Absorption}}{\text{Absorptionskoeffizient} \times \text{Probenvolumen} \times \text{Zeit} \times \text{Schichtdicke}} = \text{Enzymaktivität}$$

3.2.5.2 Bestimmung der sauren β-Glucosidaseaktivität nach Gatt (1969)

Das *p*-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid (Sigma, Deisenhofen) wird zur Bestimmung der Aktivität der sauren β-Glucosidase (EC 3.2.1.21) eingesetzt. Als Produkt der Enzymreaktion entsteht das bei 405 nm messbare *p*-Nitrophenol.

Substrat: 4 mM *p*-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid
 0.2 M Natrium-Acetatpuffer pH 5.0
 0.2 % [v/v] Triton X-100
 0.2 % [w/v] Natrium-Taurocholat

Stopplösung: 0.4 M Glycin/ NaOH pH 10.4

Von den mit 0.9 % [w/v] Natriumchlorid verdünnten Proben (dichter Pool: 1:10, ultrazentrifugierte Membranen 1:20, immunoaffinitätsgereinigte Membranen 1:10 bis 1:20) wurden 30 µL mit dem gleichen Substratvolumen in 1.5 mL Reaktionsgefäßen gemischt und 60 bis 120 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Durch Zugabe von 300 µL 0.4 M Glycin/ NaOH pH 10.4 wurde die Reaktion gestoppt. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 14 000 Umdrehungen pro Minute (18 500 * g_{max}) wurden 300 µL des Überstandes in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 405 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die Schichtdicke der Lösung betrug 1 cm. Die Enzymaktivität wurde nach der in Kapitel 3.2.5.1 beschriebenen Formel berechnet.

3.2.5.3 Bestimmung der Acetyl-Coenzym A: α-Glucosaminid *N*-Acetyltransferase modifiziert nach Meikle et al. (1995)

In diesem Enzymtest dient das [³H] D-Glucosamin (ICN, Meckenheim) als Akzeptor der Acetylgruppe. Das acetylierte Produkt wird chromatographisch über einen Kationenaustauscher vom Substrat getrennt und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

Reaktionspuffer: 100 mM Natriumphosphat
100 mM Natriumtartrat pH 6.8

Reaktionsgemisch je 10 µL Probe: 1 µL [³H] D-Glucosamin HCl
0.2 µL 100 mM Acetyl-Coenzym A in Wasser
9.55 µL Reaktionspuffer

Zur Herstellung der Kationenaustauschersäule in einer Pasteurpipette wurde zuerst etwas silanisierte Glaswolle (Machery-Nagel, Düren) in die Pasteurpipette gegeben und am Boden der Säule leicht angedrückt. Hierauf wurde, bis zu einem Bettvolumen von 250 µL, eine wässrige Suspension des Kationenaustauschers DOWEX 50 W x 8 H⁺-Form, Korngröße 50-100 (Roth, Karlsruhe) gefüllt.

Für den Enzymtest wurde das Reaktionsgemisch zu 10 µL Probe pipettiert, gemischt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 500 µL kaltem (4 °C) Wasser wurde die Reaktion abgestoppt. Der gesamte Reaktionsansatz (520 µL) wurde auf die Kationenaustauschersäule pipettiert und sechs Mal mit 250 µL Wasser gewaschen. Zu den vereinigten Eluatzen wurden 2 mL Szintillationscocktail (Ultima Gold X R von Packard, Dreieich) gefügt und im 1600 TR Flüssigkeitsszintillationszähler (Canberra Packard, Dreieich) im ³H-Kanal gemessen.

3.2.5.4 Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Als Substrat für Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) wird das *p*-Nitrophenylphosphat (Sigma) eingesetzt. Als Produkt der Enzymreaktion entsteht das bei 405 nm messbare *p*-Nitrophenol.

Substrat: 5 mM *p*-Nitrophenylphosphat
0.25 M Saccharose
5 mM Magnesiumchlorid
50 mM Tris/HCl pH 9.0
0.1 % [v/v] Triton X-100

Der Enzymtest wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Zu 6 µL Probe wurde 300 µL Substrat zugesetzt. Die Fraktionen 1 bis 8 wurden nicht verdünnt. Die Fraktionen 9 bis 16 zehnfach beziehungsweise hundertfach verdünnt eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 405 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die Schichtdicke der Lösung betrug 1 cm. Die Enzymaktivität wurde nach der in Kapitel 3.2.5.1 beschriebenen Formel berechnet.

3.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung des Rinderserumalbumins als Standardprotein (0 bis 140 µg/mL) durchgeführt.

Die Quantifizierung des Proteins erfolgte in Mikrotiterplatten. Zu 20 µL einer Probe wurden 300 µL des Reaktionsgemisches (1:5 verdünntes Fertigreagenz von BioRad, München) pipettiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

Die Proben, die neben den Membranproteinen auch Percoll® enthielten, das den Protein-test stört, wurden mit einer Lösung aus 0.25 M NaOH/ 0.025 % [v/v] Triton verdünnt. Die Natronlauge führt zum Ausfällen des Percoll® und ist nach einer 10-minütigen Zentrifugation als milchiger Niederschlag erkennbar. Das Triton X-100 diente dem Solubilisieren der Membranproteine (Vincent und Nadeau, 1983).

3.2.7 Natriumcarbonat-Behandlung nach Fujiki et al. (1982a)

Pro Versuchsansatz wurden 2.5 bis 25 µL lysosomale Membranproteine eingesetzt, die einer Proteinmenge von 50 µg Protein entsprachen. Die ultrazentrifugierten (siehe 3.2.3.3) oder immunoaffinitätsgereinigten (siehe 3.2.3.4) Membranproteine wurden mit Wasser und ungepuffertem 1 M Natriumcarbonat (pH etwa 11.5) bis zu einer Proteinkonzentration von 0.8 mg/mL und einer Natriumcarbonatkonzentration von 100 mM verdünnt. Diese Suspension wurde 30 Minuten bei 0 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 1 M HCl neutralisiert und mit einem Probenvolumen 20 mM Tris/HCl pH 7.4 gepuffert.

Die Proben wurden mit 10 mM Tris/HCl pH 7.4 auf ein Endvolumen von 100 bis 150 µL gebracht und eine Stunde bei 50 000 Umdrehungen pro Minute ($265\,205 \times g_{\max}$), 4 °C und freiem Auslaufen des 60 Ti Rotors zentrifugiert. Das Volumen wurde so gewählt, dass ein Pelletieren der Membranproteine und ein deutliches Abtrennen des Überstandes gewährleistet war.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und mit einem fünffachen Volumen Aceton bei -20 °C über Nacht gefällt.

Das Lösen der Membranproteine erfolgte in 2 Stufen: durch zehnminütiges Mischen der 2D5-C1Z-Membranen mit erstens 1 % [w/v] 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino-3-propan-sulfonat (CHAPS; Calbiochem, Schwalbach) in 10 mM Tris/HCl pH 7.4 bei 37 °C und zweitens mit 0.5 % [w/v] CHAPS bei gleichen Puffer- und Temperatur-Bedingungen. An

jeden Schritt schloss sich eine einminütige Zentrifugation bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$) und 4 °C an. Die beiden Überstände wurden vereinigt und über Nacht mit dem fünffachen Volumen Aceton bei -20 °C gefällt. Der Niederschlag wurde verworfen.

Am darauf folgenden Tag schloss sich hieran eine 15-minütige Zentrifugation bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$) und 0 °C an. Die Acetonüberstände wurden verworfen und die Niederschläge zwei Mal mit 150 µL eiskaltem 80 % [v/v] Aceton gewaschen, um Reste des die isoelektrische Fokussierung störenden Natriumcarbonats zu entfernen.

3.2.8 Deglykosylierung lysosomaler immunoaffinitätsgereinigter Membranproteine

3.2.8.1 Neuraminidase – Behandlung mit anschließender Acetonfällung

Zweifach Neuraminidasepuffer: 100 mM Natriumacetat pH 5.5
 8 mM Calciumchlorid
 1.2 % [w/v] CHAPS

Proteinaseinhibitoren (Endkonzentration): 0.5 mM Iodacetamid
 0.01 mM Leupeptin
 0.001 mM Pepstatin A
 1.0 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
 0.001 mM Z-Phe-Phe-diazomethylketon

Zu 25 µg 2D5-C1Z-Membranprotein (siehe 3.2.3.4) wurden die Proteinaseinhibitoren und 0.5 mU Neuraminidase pipettiert. Dieser Reaktionsansatz wurde mit dem gleichen Volumen des zweifachkonzentrierten Neuraminidasepuffers gemischt und anschließend 4 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach der Behandlung mit der Neuraminidase wurde die Probe 5 Minuten bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$) zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das Sediment wurde mit 15 bis 25 µL einer Lösung aus 2 % [w/v] CHAPS in zweifachem TBS – dem Volumen des 2D5-C1Z-Membranproteins entsprechend – gemischt und 10 Minuten bei 37 °C und kontinuierlicher Bewegung inkubiert. Abschließend folgte eine fünfminütige Zentrifugation 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$). Der Überstand wurde mit dem ersten vereinigt. Der Niederschlag wurde verworfen.

Der Überstand wurde nun mit dem fünffachen Volumen an Aceton (Raumtemperatur) gemischt, um die Proteine über Nacht bei -20 °C zu präzipitieren. Am folgenden Tag wurde die Probe 15 Minuten bei 0 °C und 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$)

zentrifugiert. Der Acetonüberstand wurde verworfen und das Proteinpellet für eine anschließende Deglykosylierung oder direkt für die isoelektrische Fokussierung verwendet.

3.2.8.2 Peptid N-Glycopeptidase-F (PNGase F) Behandlung

PNGase F - Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7.4
1.2 % [v/v] Nonidet P-40 (Roth, Karlsruhe)
0.2 % [w/v] Natriumdodecylsulfat (SDS) (Roth, Karlsruhe)
10 mM EDTA pH 8.0

Das 25 µg 2D5-C1Z-Membranprotein (siehe 3.2.3.4) entsprechende Probenvolumen wurde eine Minute bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum Niederschlag die dem Probenvolumen entsprechende Menge an Inkubationspuffer zugefügt. Anschließend wurden die Membranproteine durch eine zehnminütige Inkubation bei 37 °C und kontinuierlichem Mischen der Lösung von den 2D5-Eupergit C1Z-Perlen gelöst. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Der Niederschlag wurde verworfen.

Dem Reaktionsansatz wurde noch das einfache Probenvolumen Wasser zugefügt, bevor nach Zugabe von 0.01 bis 0.03 Einheiten Peptid N-Glycosidase F 4 Stunden oder über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde.

Sollte die Deglykosylierung bei Aceton-gefällten Proben durchgeführt werden, so wurde das Aceton-Pellet in 5 µL Inkubationspuffer gelöst und 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µL Wasser und den äquivalenten Mengen an Enzym folgte eine vierstündige Inkubation bei 37 °C.

Bei den für die Untersuchung des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins eingesetzten Proben, wurde die beschriebene fünfminütige Inkubation bei 95 °C durch eine zehnminütige bei 37 °C ersetzt.

3.2.9 Trennung von Membranproteinen mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli (1970) mit Modifikationen von Hasilik und Neufeld (1980) durchgeführt.

Das apparente Molekulargewicht wurde semilogarithmisch aus den Wanderungsstrecken der einzelnen Banden ermittelt. Als Standards wurden Myosin (200 kDa), β -Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97.4 kDa), Rinderserumalbumin (69 kDa), Ovalbumin (46 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (21 kDa), Lysozym (14.4 kDa) und Aprotinin (6.5 kDa) eingesetzt.

3.2.9.1 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele

Es wurden generell 1 mm dicke Gele verwendet. Ein- und zweidimensionale Gele unterschieden sich in der Länge des Trenngels. Bei ersterem betrug sie 9.5 cm und bei letzterem 11 cm. Die so genannten „Ohrenplatten“ zum Gießen der Gele für die vertikale zweidimensionale Elektrophorese waren am oberen Ende nach innen um etwa 45° angeschrägt, um die Auflagefläche für die Röhrchengele zu vergrößern.

Die Pipettierschemata zur Herstellung der verwendeten ein- bzw. zweidimensionalen Gele verschiedener Acrylamidkonzentration werden im Anhang in Tabelle 8.2 und 8.3 gezeigt.

3.2.9.2 Probenvorbereitung für die eindimensionale SDS-PAGE

Probenpuffer (Solubilizer):	1.43-fach Sol 100 -SH:	0.36 M Tris/HCl pH 6.8 28.6 % [v/v] Glycerin 2.86 % [w/v] SDS
	1.43-fach Sol 100 +SH:	0.36 M Tris/HCl pH 6.8 28.6 % [v/v] Glycerin 2.86 % [w/v] SDS 28.6 mM DTT
	Sol 100 -SH:	0.25 M Tris/HCl pH 6.8 20 % [v/v] Glycerin 2 % [w/v] SDS
	Sol 100 +SH:	0.25 M Tris/HCl pH 6.8 20 % [v/v] Glycerin 2 % [w/v] SDS 20 mM DTT

Ausschließlich die Proben der immunoaffinitätsgereinigten Membranproteine, die je nach Versuchsansatz unterschiedliche Volumina hatten, wurden mit den Probenpuffer (Sol 100 +SH und 1.43-fach Sol 100 +SH) in dem Maße verdünnt, dass sie, unabhängig von der Proteinkonzentration, folgende Endkonzentrationen aufwiesen und ein gewisses Endvolumen (15 μ L bei Gelen mit 33 Taschen und 45 μ L bei Gelen mit 22 Taschen) nicht überschritten:

Endkonzentration der Probe:	0.125 mM	Tris/HCl pH 6.8
	10 % [v/v]	Glycerin
	1 % [w/v]	SDS
	10 mM	DTT.

Alle Proben, außer die für den Nachweis des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins vorgesehenen, wurden nach dem Solubilisieren 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Proben zum Nachweis des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins wurden 10 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Um so genannte „Schattenbanden“ bei einer an die Elektrophorese anschließenden Silberfärbung zu vermeiden, wurde zu den entsprechenden Proben 0.5 M Iodacetamid bis zu einer Endkonzentration von mindestens 25 mM hinzugefügt. Es folgte eine zehnmünütige Inkubation bei 37 °C.

Die an 2D5-Eupergit C1Z gekoppelten Membranproteine wurden mit dem nicht reduzierenden Probenpuffer (Sol 100 –SH und 1.43-fach Sol 100 –SH) bis zu einer Endkonzentration von 0.125 mM Tris/HCl pH 6.8, 10 % [v/v] Glycerin und 1 % [w/v] SDS gemischt und 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$) und 4 °C. Dem Überstand wurde 1 M DTT bis zu einer Endkonzentration von 10 mM zugefügt und 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Pellet wurde verworfen.

Vor dem Probenauftrag wurden Percoll®-haltige Proben 10 Minuten bei 18 000 Umdrehungen pro Minute ($36\,410 \cdot g_{\max}$), alle anderen bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$) und 4 °C zentrifugiert.

3.2.9.3 Gelelektrophorese

Anodenpuffer:	384 mM Glycin
	23 mM Tris
	Es stellt sich ein pH-Wert von 8.3 ein.

Kathodenpuffer:	384 mM Glycin
	23 mM Tris
	0.1 % [w/v] SDS
	0.8 ppm [w/v] Bromphenolblau

Für die Elektrophorese wurden 5 L gekühlter Anodenpuffer (4 °C) und 250 mL gekühlter Kathodenpuffer (4 °C) benötigt. Im Sammelgelbereich wurde eine Stromstärke von 15 mA und im Trenngelbereich von 30 mA je Gel angelegt. Die Elektrophorese wurde etwa 4 mm vor dem Auslaufen der Bromphenolblaubande beendet. Hieran schloss sich der direkte Nachweis mittels Silberfärbung oder ein Western-Blot an.

3.2.10 Auftrennung von Membranproteinen durch isoelektrische Fokussierung (IEF) und zweidimensionale Elektrophorese

3.2.10.1 Röhrchengele mit Trägerampholyten

3.2.10.1.1 Vertikale isoelektrische Fokussierung

Lösungen für die isoelektrische Fokussierung

IEF-Acrylamidstammlösung: 28.4 % [w/v] Acrylamid
 1.6 % [w/v] *N,N'*-Methylenbisacrylamid

Die IEF-Acrylamidstammlösung wurde zum Binden von Acrylsäure mit Amberlite® AG Typ MB-1 der Korngröße 20-50 (mesh) eine Stunde entionisiert, anschließend filtriert, aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Probenüberschichtung: 0.8 % [v/v] einer 40 % [w/v] Trägerampholytenlösung pH 4-7¹
 0.2 % [v/v] einer 40 % [w/v] Trägerampholytenlösung pH 3-10¹

 7 M Harnstoff

Gelüberschichtung: 6.5 M Harnstoff

Lysis-Puffer: 9 M Harnstoff
 4 % [w/v] CHAPS
 2 % [v/v] einer 40 % [w/v] Trägerampholytenlösung pH 4-7
 0.5 % [v/v] einer 40 % [w/v] Trägerampholytenlösung pH 3-10
 10 mM Dithiotreitol (DTT)

Probenüberschichtung, Gelüberschichtung und Lysis-Puffer wurden aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Anodenelektrolyt: 0.01 M H₃PO₄

Kathodenelektrolyt: 0.02 M NaOH

¹ (SERVA, Heidelberg)

Gießen der IEF-Röhrchengele

Lösung für 5 IEF-Röhrchengele:

2.25 g Harnstoff
500 µL einer 40 % [w/v] Trägerampholytenlösung pH 4-7
125 µL einer 40 % [w/v] Trägerampholytenlösung pH 3-10
665 µL IEF-Acrylamidstammlösung
500 µL 20 % [w/v] CHAPS
1670 µL Wasser

Die Glasröhrchen (16 cm lang, mit einem inneren Durchmesser von 3.1 mm) werden bei 12.5 cm markiert (spätere Gelhöhe), an einer Seite mit Parafilm dicht verschlossen und senkrecht in einen Ständer gestellt.

Die Lösung für die IEF-Röhrchengele wird 15 Minuten entgast, nach Zugabe von 2 µL *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 40 µL 10 % [w/v] Ammoniumpersulfat (APS) mit Hilfe einer Pasteurpipette bis zur Markierung in die Glasröhrchen gefüllt und mit 130 µL 6.5 M Harnstoff (Gelüberschichtung) vorsichtig überschichtet. Die Röhrchengele sind nach etwa 4 Stunden vollständig auspolymerisiert und können bis zum Einsatz mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden.

Vorbereitung der Proben für die isoelektrische Fokussierung

Die eingesetzte Proteinmenge lag zwischen 25 und 500 µg und entsprach einem maximalen Volumen von 25 µL. Die gewünschte Menge ultrazentrifugierter Membranen (siehe 3.2.3.3) wurden in 100 µL Lysis-Puffer solubilisiert.

Die immunoaffinitätsgereinigten Membranproteine (siehe 3.2.3.4) wurden in 82 µL 11 M Harnstoff und 10 µL 40 % [w/v] CHAPS durch zehnminütiges Mischen bei 37 °C gelöst. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$) und 4 °C. Dem Überstand wurden 2 µL einer 40 % [w/v] Trägerampholytenlösung pH 4-7, 0.5 µL einer 40 % [w/v] Trägerampholytenlösung pH 3-10 und 1 µL 1 M DTT zugefügt und gemischt. Das Pellet wurde verworfen.

Isoelektrische Fokussierung

Etwa 2 Stunden vor dem Start der isoelektrischen Fokussierung wurde die Gelüberschichtung der Röhrchengele durch 100 µL Lysis-Puffer ersetzt und dieser vorsichtig bis zum Ende des Glasröhrchens mit Wasser überschichtet. Nach dem vertikalen Einsetzen der Glasröhrchen in die vorbereitete Protean® II xi 2-D Cell (IEF-Kammer von BioRad, München) wurde die Überschichtung (Lysis-Puffer und Wasser) der Röhrchengele entfernt und das der Anode zugewandte Ende des Glasröhrchens mit einem 2 cm² großen, in Anodenpuffer eingeweichten Stück Dialyseschlauch – mit einem Gummiring fixiert – verschlossen.

Unmittelbar vor dem Auftrag wurden die Proben 10 Minuten bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$) und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand luftblasenfrei auf die entsprechenden Röhrchen pipettiert, hierauf folgten 20 μ L Probenüberschichtung und abschließend Kathodenelektrolyt bis zum Ende der Glasröhrchen.

In den unteren Puffertank der Protean® II xi 2-D Cell (BioRad, München) wurden nun 2.5 L des Anodenelektrolyts (0.01 M H_3PO_4) und in das obere Pufferreservoir 0.5 L des entgasten Kathodenelektrolyts (0.02 M NaOH) gegeben. Die anschließende über 20.7 Stunden dauernde isoelektrische Fokussierung wurde bei 4 °C mit den abschließend beschriebenen Spannungsstufen durchgeführt.

Stufe 1:	30 Minuten	200 Volt
Stufe 2:	18.2 Stunden	500 Volt
Stufe 3:	1 Stunde	800 Volt
Stufe 4:	1 Stunde	1000 Volt

3.2.10.1.2 SDS-PAGE im Anschluss an die vertikale isoelektrische Fokussierung

Equilibrierungspuffer I: 0.05 M Tris/HCl pH 6.8
0.25 % [w/v] DTT
4 % [w/v] SDS
15 % [v/v] Glycerin

Equilibrierungspuffer II: 0.05 M Tris/HCl pH 6.8
25 mM Iodacetamid
4 % [w/v] SDS
30 % [v/v] Glycerin
6 M Harnstoff

0.5 % [w/v] Agarose (LM) in Sammelgelpuffer: 125 mM Tris/HCl pH 6.8

0.5 % [w/v] Agarose (LM) in Toppuffer: 384 mM Glycin
23 mM Tris
0.1 % [w/v] SDS
0.8 ppm Bromphenolblau

Im Anschluss an die isoelektrische Fokussierung wurden die Glasröhrchen aus der IEF-Kammer genommen, der Überstand entfernt und die Röhrchengele mit Hilfe einer mit Wasser gefüllten 5 mL-Einwegspritze vorsichtig aus dem Glasröhrchen in eine Kunststoffschale gepresst. Das alkalische Ende des Gels wurde mit einer Bromphenolblaulösung markiert. Hierauf folgte unter sanftem Schütteln eine 20-minütige Equilibrierung der Gele in je 25 mL Equilibrierungspuffer I bei 37 °C. Anschließend wurde diese Lösung verworfen und durch das gleiche Volumen Equilibrierungspuffer II ersetzt. Es folgten die bereits beschriebenen Equilibrierungsbedingungen.

Die Überschichtungslösung der SDS-Polyacrylamidgele wurde abgesaugt, etwa 500 µL Agarose (70 °C) (NUSIEVE® GTG® Agarose der Firma Biozym, Hess. Oldendorf) in Sammelgelpuffer wird zwischen die Glasplatten pipettiert und die Röhrchengele luftblasenfrei mit dem alkalischen Ende auf der dem Molekulargewichtsstandard gegenüberliegenden Seite auf das SDS-Polyacrylamidgel gelegt. Abschließend wurden die Röhrchengele mit etwa 750 µL Agarose in Trenngelpuffer fixiert.

Die Elektrophorese verlief nach den unter 3.2.9.3 beschriebenen Bedingungen.

3.2.10.1.3 pH-Bestimmung bei fokussierten Röhrchengelen

Der pH-Gradient des Röhrchengels wurde nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung wie folgt bestimmt. Das Röhrchengel wurde in 0.5 cm lange Segmente geschnitten, die anschließend 4 Stunden in je 400 µL Wasser auf dem Drehrad bei 4°C inkubierten. Der jeweilige pH-Wert der einzelnen Lösungen wurde mit einem pH-Meter (Mettler-Toledo, Gießen) gemessen.

3.2.10.2 Immobilisierte pH-Gradienten

Die zweidimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten wurde nach Görg et al. (1988) durchgeführt. Die immobilisierten pH-Gradienten werden durch lineares Mischen zweier unterschiedlicher Polymerisationslösungen mit einem so genannten Gradientenmischer hergestellt.

3.2.10.2.1 Horizontale isoelektrische Fokussierung

Lysis-Puffer: 9 M Harnstoff
 4 % [w/v] CHAPS
 1 % [v/v] einer 40 % [w/v] Trägerampholytenlösung pH 4-7
 10 mM DTT

Vorbereitung der Proben für die isoelektrische Fokussierung

Die eingesetzte Proteinmenge lag zwischen 25 und 250 µg. Die gewünschte Menge ultrazentrifugierter Membranen (siehe 3.2.3.3) wurde mit Lysis-Puffer auf 200 µL gebracht, lysiert und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Die 2D5-Eupergit C1Z gekoppelten Membranproteine (siehe 3.2.3.4) wurden in 9 M Harnstoff, 4 % [w/v] CHAPS und 1 % [v/v] einer 40 % [w/v] Trägerampholytenlösung pH 4-7 durch zehnminütiges Mischen bei 37 °C lysiert (Endvolumen 200 µL). Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \times g_{\max}$) und 4 °C. Dem Überstand

wurden 2 µL 1 M DTT zugefügt und diese Suspension 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Pellet wurde verworfen.

Unmittelbar vor dem Einquellen der Proben in die Immobilstreifen pH 4-7 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurden sie 10 Minuten bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$) und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in dickwandige Reagenzgläser pipettiert, die Immobilstreifen mit der Gelseite nach unten in die Reagenzgläser gelegt und letzteres mit Parafilm abgedichtet. Horizontal gelagert konnte nun die Probe über Nacht bei Raumtemperatur in das Streifengel einquellen.

Isoelektrische Fokussierung

In eine Kunststoffwanne mit entsprechenden Vertiefungen für die Streifengele wurde Paraffinöl (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gegeben und die Immobilstreifen, mit den eingequollenen Proben, mit der Ausrichtung des alkalischen Endes in eine Richtung in die vorgesehenen Vertiefungen gelegt. Zwei in Wasser getränkte, leicht abgetropfte, 6 mm breite Elektrodenstreifen (Electrode wicks extra size, 300 mm x 6 mm x 3 mm; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurden unter Paraffinöl auf die Enden der Immobilstreifen gelegt. Ihre Länge richtete sich nach der Anzahl der Streifengele. Abschließend wurde die Vorrichtung mit den Platinelektroden auf die Elektrodenstreifen gelegt und beschwert.

Die abschließende isoelektrische Fokussierung wurde bei Raumtemperatur mit den nachfolgend beschriebenen Spannungsstufen durchgeführt:

Stufe 1:	2 Stunden	300 Volt
Stufe 2:	2 Stunden	1000 Volt
Stufe 3:	18 Stunden	3000 Volt

3.2.10.2.2 SDS-PAGE im Anschluss an die horizontale isoelektrische Fokussierung

Equilibrierungspuffer I:	0.05 M Tris/HCl pH 6.8 0.25 % [w/v] DTT 4 % [w/v] SDS 15 % [v/v] Glycerin
Equilibrierungspuffer II:	0.05 M Tris/HCl pH 6.8 25 mM Iodacetamid 4 % [w/v] SDS 30 % [v/v] Glycerin 6 M Harnstoff

Im Anschluss an die isoelektrische Fokussierung wurden die Immobilstreifen aus der mit Paraffinöl gefüllten Wanne genommen, überschüssiges Paraffinöl entfernt und die Streifen-

gele in einer mit 25 mL 37 °C warmem Equilibrierungspuffer I gefüllten Kunststoffschale 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine 15-minütige Inkubation der Streifengele in 25 mL 37 °C warmem Equilibrierungspuffer II, ebenfalls bei Raumtemperatur.

Die Übersichtungslösung der SDS-Polyacrylamidgele wurde abgesaugt, etwa 2 mL Toppuffer zwischen die Glasplatten pipettiert und die Immobilinstreifen luftblasenfrei mit dem alkalischen Ende auf der dem Molekulargewichtsstandard gegenüberliegenden Seite auf das SDS-Polyacrylamidgel gelegt. Abschließend wurde der Toppuffer wieder abgesaugt und die Streifengele mit 500 µL Agarose in Trenngelpuffer fixiert.

Die Elektrophorese verläuft nach den unter 3.2.9.3 beschriebenen Bedingungen.

3.2.11 Direkter Nachweis der über SDS-PAGE getrennten Membranproteine

Der Vor- beziehungsweise Nachteil der unter Punkt 3.2.11.1 und 3.2.11.2 beschriebenen Protokolle zur Silberfärbung liegt unter anderem im deutlich verschiedenen Zeitaufwand. So dauert die Färbung abzüglich der über Nacht Inkubation, die bei beiden Methoden nötig ist, entweder 1.5 Stunden (Heukeshoven und Dernick, 1988) oder 6.5 Stunden (Heukeshoven und Dernick, 1986).

3.2.11.1 Silberfärbung zweidimensionaler SDS-Polyacrylamidgele nach Heukeshoven und Dernick (1988)

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die zweidimensionalen Gele zwei Mal 15 Minuten in 100 mL Fixierer (30 % [v/v] Ethanol, 10 % [v/v] Essigsäure in Wasser) inkubiert. Die hierauf folgende Natriumthiosulfatbehandlung (je 100 mL) wurde über Nacht durchgeführt.

Natriumthiosulfatlösung: 0.1 M Natriumacetat pH 6.0
 30 % [v/v] Ethanol
 0.55 % [w/v] Natriumthiosulfat
 in Wasser

Nach dreimaligem zehnminütigen Wässern erfolgte eine 25-minütige Inkubation in je 100 mL einer 0.1 % [w/v] Silbernitratlösung (0.1 % [w/v] Silbernitrat, 0.01 % [v/v] Formaldehyd in Wasser).

Die Entwicklung der Gele erfolgte in insgesamt 200 mL einer 2.5 % [w/v] Natriumcarbonatlösung, die 0.02 % [v/v] Formaldehyd enthält. Die Färbung der Gele wurde durch Zugabe weniger mL konzentrierter Essigsäure abgestoppt. Nach mehrmaligem Wässern wurden sie mit „Gelfix“ (50 % [v/v] Ethanol, 2 % [v/v] Glycerin in Wasser) geschrumpft und zwischen Cellophan (Pütz Folien, Taunusstein) bei Raumtemperatur oder 37 °C getrocknet.

3.2.11.2 Silberfärbung zweidimensionaler SDS-Polyacrylamidgele mit Glutardialdehyd nach Heukeshoven und Dernick (1986)

Nach der Elektrophorese wurden die SDS-Polyacrylamidgele drei Mal eine Stunde in je 125 mL Fixierer inkubiert.

Fixierer: 30 % [v/v] Ethanol
 10 % [v/v] Essigsäure
 in Wasser

Die anschließende Inkubation in zwei Mal 125 mL einer Natriumthiosulfatlösung erfolgte in zwei Schritten: der erste über Nacht und der zweite am darauf folgenden Tag für eine Stunde.

Natriumthiosulfatlösung: 0.2 % [w/v] Natriumthiosulfat-Pentahydrat
 0.5 M Natriumacetat-Trihydrat
 30 % [v/v] Ethanol
 0.5 % [w/v] Glutardialdehyd
 in Wasser

Nach der Natriumthiosulfatbehandlung wurden die Gele drei Mal 0.5 Stunden gewässert. Hierauf folgend wurden die Gele eine Stunde in 125 mL einer Silbernitratlösung inkubiert.

Silbernitratlösung: 0.1 % [w/v] Silbernitrat
 0.02 % [v/v] Formaldehyd
 in Wasser

Die Gele wurden in zwei Schritten mit je 125 mL Lösung entwickelt. Die erste Lösung wurde abgesaugt, sobald sie sich schwarzbraun verfärbte.

Entwickler: 2.5 % [w/v] Natriumcarbonat
 in Wasser (mit Natriumhydrogencarbonat pH 11.3 einstellen)
 0.01 % [v/v] Formaldehyd

Sobald die gewünschte Färbung erreicht war, wurde die Silberlösung abgesaugt und die Reaktion mit 125 mL einer 0.05 M Glycinlösung gestoppt. Nach mehrmaligem Wässern wurden die Gele mit „Gelfix“ (50 % [v/v] Ethanol, 2 % [v/v] Glycerin in Wasser) geschrumpft und zwischen Cellophan (Pütz Folien, Taunusstein) bei Raumtemperatur oder 37 °C getrocknet.

3.2.11.3 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Präparative Acrylamidgele wurden mit Coomassie-Brilliant-Blau, einem Triphenylmethanfarbstoff, gefärbt.

Färbelösung: 0.1 % [w/v] SERVA blue R (SERVA, Heidelberg)
 40 % [v/v] Methanol
 10 % [v/v] Essigsäure
 in Wasser

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die SDS-Polyacrylamidgele über Nacht bei Raumtemperatur in 150 mL Färbelösung inkubiert.

Entfärber I: 50 % [v/v] Methanol
 10 % [v/v] Essigsäure
 in Wasser

Entfärber II: 30 % [v/v] Methanol
 10 % [v/v] Essigsäure
 in Wasser

Entfärber III: 10 % [v/v] Methanol
 10 % [v/v] Essigsäure
 in Wasser

Am folgenden Tag wurde die Lösung abgesaugt, das Gel kurz gewässert und so lange in 150 mL Entfärber I inkubiert, bis das Gel und der Entfärber dieselbe Intensität der Blaufärbung zeigten. Diese Lösung wurde verworfen und das Gel so lange in 150 mL Entfärber II inkubiert, bis sich wieder ein Farbgleichgewicht zwischen der Lösung und dem Gel einstellte. Der letzte Entfärbeschritt – mit 150 mL Entfärber III – wurde bis zur maximal möglichen Reduktion der unspezifischen Hintergrundfärbung des Gels durchgeführt.

Nach mehrstündigem Wässern und einer 30-minütigen Inkubation in 2 % [v/v] Glycerin wurden die Gele zwischen Cellophan (Pütz Folien, Taunusstein) bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.12 Western Blotting

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mit Hilfe des Semidry-blotting auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) (Hybond P; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) transferiert.

Waschpuffer: 23 mM Tris
 384 mM Glycin

Anodenpuffer: 40 mM ϵ -Aminocapronsäure
25 mM Glycin
Es stellt sich ein pH Wert von 8.7 ein.

Kathodenpuffer: 25 mM Tris
192 mM Glycin
Es stellt sich ein pH-Wert von 8.3 ein.

Es wurden je 250 mL Anoden- und Kathodenpuffer angesetzt und 30 Minuten entgast.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese zur Entfernung von SDS 20 Minuten in Waschpuffer inkubiert.

Auf die Anode der Semidry-blotting-Apparatur (cti, Idstein/Taunus) wurden zwei Lagen in Anodenpuffer getränkte GB 004-Filterpapiere (Schleicher & Schüll, Dassel) gelegt. Hierauf folgte die nach Anleitung des Herstellers vorbehandelte PVDF-Membran, das Gel und abschließend zwei Lagen in Kathodenpuffer getränkte GB 004-Filterpapiere. Den Abschluss der Blotting-Apparatur bildete die Kathode.

Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 2 mA pro cm² PVDF-Membran für eine Stunde bei 4 °C. Nach dem Western-Blotting wurde der Molekulargewichtsstandard von der Membran abgeschnitten, für wenige Minuten mit Coomassie® (0.1 % [w/v] SERVA blue R (SERVA, Heidelberg), 40 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure in Wasser) gefärbt und mit 80 % [v/v] Methanol entfärbt.

Der für die Immundetektion vorgesehene Teil der Membran wurde über Nacht bei 4 °C in Blockierungsreagenz (siehe 3.2.13) inkubiert.

3.2.13 Immundetektion nach Western-Blotting

Blockierungsreagenz („Blotto“): 5 % [w/v] Magermilchpulver
50 mM Tris/HCl pH 7.8
0.05 % [v/v] Triton X-100
0.01 % [v/v] Antifoam A (Sigma, Deisenhofen)
2 mM Calciumchlorid

phosphatgepufferte Natriumchloridlösung (PBS): 150 mM Natriumchlorid
10 mM Natriumphosphat pH 7.4

PBS-T: 0.5 % [v/v] Tween-20 (MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn) in PBS

Die über Nacht in Blotto inkubierte PVDF-Membran (siehe 3.2.12) wurde zweimal kurz in PBS gewaschen. Hieran schloss sich eine zweistündige Inkubation mit dem ersten – gegen das gesuchte Protein gerichteten – Antikörper in Blotto bei Raumtemperatur an.

Die jeweilige Verdünnung richtete sich sowohl nach der Güte des Antikörpers als auch nach der geplanten Visualisierung, die durch die Wahl des zweiten unspezifischen Antikörpers festgelegt wurde (siehe Tabelle 3.5).

Im Anschluss an diese Inkubation wurde die Antikörperlösung verworfen und die schon beschriebenen Waschschrte mit PBS und PBS-T durchgeführt. Hierauf folgte erneut eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur, diesmal mit dem zweiten Antikörper in Blotto. Die Wahl und Verdünnung dieses Antikörpers richtete sich nach dem Ursprung des ersten, Maus oder Kaninchen, und nach der geplanten Detektion: entweder gekoppelt mit der alkalische Phosphatase (alk. P.) oder der Meerrettichperoxidase (POD).

Auch die zweite Antikörperlösung wurde im Anschluss an die Inkubation verworfen und die PVDF-Membran wie beschrieben mit PBS und PBS-T gewaschen.

Tab. 3.3: Liste der verwendeten spezifischen und unspezifischen Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen und der abschließenden Visualisierung.

Erster Antikörper	Zweiter Antikörper	Visualisierung
NPC-1 C (1:2000)	Ziege-gegen-Kaninchen alk. P. (1:2000)	NBT/BCIP
NPC-1 C (1:4000 bis 1:6000)	Ziege-gegen-Kaninchen POD (1:6000 bis 1:10000)	ECL
2D5 (1:2000 bis 1:4000)	Ziege-gegen-Maus alk. P. (1:2000 bis 1:4000)	NBT/BCIP
α -CD (1:4000)	Ziege-gegen-Kaninchen POD (1:4000)	DAB/ H ₂ O ₂

3.2.13.1 Nachweis mittels Meerrettichperoxidase

Diaminobenzidin/Wasserstoffperoxid (DAB/ H₂O₂)

Substrat der Meerrettichperoxidase:

- 10 mg 3,3' Diaminobenzidin Hydrochlorid (Sigma, Deisenhofen)
- 0.2 mL 1 M Tris/HCl pH 8.0
- 20 mL Wasser
- mit Tris-Base auf pH 7.4 einstellen
- 5 µL 30 % [v/v] Wasserstoffperoxidlösung

Das frisch angesetzte Substrat der Meerrettichperoxidase wurde auf den gewaschenen (siehe 3.2.13) Western-Blot gegeben, die Reaktion nach der gewünschten Anfärbung mit Wasser gestoppt, die PVDF-Membran nochmals gewässert und auf einem saugfähigen Papiertuch getrocknet.

Enhanced Chemoluminescence (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Zur Reduktion unspezifischer Hintergrundsignale wurde der Western-Blot im Anschluss an die Inkubation des zweiten Antikörpers drei Mal mindestens 10 Minuten mit PBS-T und abschließend zwei Mal kurz mit PBS gewaschen.

Es folgte die nach Anleitung des Herstellers empfohlene einminütige Inkubation des Western-Blots mit dem ECL-Reagenz, das anschließende Verwerfen überschüssiger Lösung und das Belichten eines Röntgenfilms (X-OMATTMAR, Kodak). Der exponierte Film wurde 5 Minuten in Kodak D-19 (Kodak-Pathé, Paris) entwickelt, kurz gewässert und weitere 5 Minuten in Acidofix (Agfa, Leverkusen) fixiert. Hieran schloss sich das Wässern und Trocknen des Films an.

3.2.13.2 Nachweis mittels alkalischer Phosphatase

Tris/HCl pH 7.4 gepufferte Natriumchloridlösung (TBS): 150 mM Natriumchlorid
10 mM Tris/HCl pH 7.4

Puffer für alkalische Phosphatase (APP): 0.1 M NaCl
0.01 M MgCl₂
0.1 M Tris/HCl pH 9.5

Stammlösung Nitroblautetrazolium (NBT): 1 % [w/v] NBT in APP

Die Stammlösung des Nitroblautetrazolium (Sigma, Deisenhofen) wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Stammlösung 5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl Phosphat (BCIP): 5 % [w/v] BCIP in DMF

Die Stammlösung des 5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl Phosphat (Sigma, Deisenhofen) wurde bei 4 °C gelagert.

Substrat der alkalischen Phosphatase: 9 mL APP
1 mL 1 % [w/v] NBT
0.1 mL 5 % [w/v] BCIP

Der im Anschluss an die Inkubation des zweiten Antikörpers bereits mit PBS und PBS-T behandelte Western-Blot wurde noch zwei Mal kurz mit TBS und APP gewaschen, bevor die PVDF-Membran im frisch angesetzten Substrat der alkalischen Phosphatase bis zur gewünschten Färbung – etwa 10 Minuten – inkubierte. Die Reaktion wurde mit Wasser gestoppt, der Western-Blot gewässert und abschließend auf einem saugfähigen Papiertuch getrocknet.

3.3 Auswertung

Computergestützte Auswertung unter Verwendung folgender Software: Microsoft-Excel, Adobe-Photoshop, Sigma-Plot.

4 Ergebnisse

Im Verlauf dieser Arbeit sollen Untersuchungen zum Proteom lysosomaler Membranproteine durchgeführt werden. Das hierfür verwendete Probenmaterial stammt ausschließlich aus humanen Plazenten. Die frischen Plazenten werden, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, zerkleinert und homogenisiert. Aus dem erhaltenen postnukleären Überstand wird in einem anschließenden Zentrifugationsschritt das so genannte Organellenkonzentrat gewonnen. Diese Organellen werden abschließend mit Hilfe eines selbstformenden linearen Percoll®-Gradient entsprechend ihrer Dichteunterschiede voneinander getrennt. Der verwendete Percoll®-Gradient wurde so gewählt, dass die Lysosomen ins dichtere untere Drittel des Gradienten „wandern“. Im Anschluss an die Fraktionierung des Percoll®-Gradienten werden die „dichten“ (dense) lysosomalen Fraktionen vereinigt und formal als „dichter Pool“ beziehungsweise als „Dense-Pool“ bezeichnet (Diettrich, 1996; Diettrich et al., 1996).

4.1 Aufreinigung und Anreicherung lysosomaler Membranproteine

Aus dem aus humaner Plazenta gewonnen dichten Pool werden die lysosomalen Membranproteine isoliert. Hierfür wird entweder die in Kapitel 3.2.3.3 beschriebene Ultrazentrifugation oder die in Kapitel 3.2.3.4 beschriebene Immunoaffinitätsreinigung verwendet. Zur Charakterisierung der lysosomalen Membranproteine werden die beiden in Tabelle 4.1 beschriebenen lysosomalen Markerenzyme bestimmt. Es handelt sich hierbei um die β -Hexosaminidase, ein lösliches Matrixprotein der Lysosomen und um die saure β -Glucosidase (Glucocerebrosidase), ein mit der lysosomalen Membran assoziiertes Enzym (Dongen et al., 1985). Es wird erwartet, dass es durch die Aufreinigung der lysosomalen Membranen aus dem dichten Pool zu deutlichen Verlusten der β -Hexosaminidase, dem löslichen lysosomalen Enzym, und zur Anreicherung der sauren β -Glucosidase, dem membranassoziierten Enzym, kommt.

Die in Tabelle 4.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es bei der Aufreinigung der lysosomalen Membran zu signifikanten Verlusten der β -Hexosaminidase kommt. Bei den ultrazentrifugierten Membranen sinkt die spezifische Aktivität auf 0.1 und bei den immunoaffinitätsgereinigten Membranen auf 0.05. Im Gegensatz dazu kommt es zur Anreicherung der sauren β -Glucosidase. Das Enzym wird bei den ultrazentrifugierten Membranen um den Faktor 1.2 und bei den immunoaffinitätsgereinigten Membranen um den Faktor 4.5 angereichert.

Ergänzend soll erwähnt werden, dass die Proteinausbeute, bezogen auf das Ausgangsmaterial, den dichten Pool, bei den ultrazentrifugierten Membranen im Durchschnitt bei 23 % und bei den immunoaffinitätsgereinigten Membranen im Durchschnitt bei 11 % liegt.

Tab. 4.1: **Anreicherung lysosomaler Membranen des dichten Pools durch Ultrazentrifugation und Immunoaffinitätsreinigung. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte der spezifischen Aktivität der entsprechenden Enzyme aus 5 Plazenten.**

	Anreicherungsfaktor lysosomaler Proteine aus dem dichten Pool durch:		Verhältnis Immunoaffinitätsreinigung zur Ultrazentrifugation
	Ultrazentrifugation	Immunoaffinitätsreinigung	
β -Hexosaminidase	0.11 (+/- 0.06)	0.05 (+/- 0.02)	0.45
saure β -Glucosidase	1.2 (+/- 0.1)	4.55 (+/- 2.5)	3.8

Zur Gewinnung lysosomaler Membranproteine ist sowohl die Ultrazentrifugation als auch die Immunoaffinitätsreinigung geeignet. In beiden Fällen kommt es zu einer deutlichen Reduktion des löslichen lysosomalen Proteins, der β -Hexosaminidase und zu einer Anreicherung der sauren β -Glucosidase, dem mit der lysosomalen Membran assoziierten Protein. Der Vergleich der beiden Präparationen führt zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei den immunoaffinitätsgereinigten Membranen mit einer 3.8-fach höheren Anreicherung der sauren β -Glucosidase im Vergleich zu den ultrazentrifugierten Membranen, um die reinere Präparation lysosomaler Membranen handelt. Der deutliche Nachteil dieser Methode liegt in der geringeren Ausbeute des lysosomalen Membranproteins, der sauren β -Glucosidase.

Nachdem die lysosomalen Membranen hinsichtlich ihrer Markerenzyme charakterisiert wurden, sollen Untersuchungen zum Proteinmuster der lysosomalen Membranproteine durchgeführt werden.

4.2 Zweidimensionale SDS-Gelelektrophorese

Die Methode mit dem höchsten Auflösungsvermögen komplexer Proteingemische ist die zweidimensionale Elektrophorese nach O'Farrell (1975). Hierbei werden die Proteine nach zwei unterschiedlichen Parametern getrennt, dem isoelektrischen Punkt (pI) in der ersten und dem Molekulargewicht in der zweiten Dimension (O'Farrell, 1975). Für die Durchführung der ersten Dimension können zwei verschiedene Methoden verwendet werden: zum einen die so genannten Röhrchengele aus Polyacrylamid mit Trägerampholyten (O'Farrell, 1975)

und zum anderen so genannte Streifengele mit linearem, immobilisiertem pH-Gradienten (IEF-Streifengel) (Görg et al., 1988). In noch nicht fokussierten Röhrchengelen herrscht ein einheitlicher pH-Wert. Der pH-Gradient bildet sich erst nach Anlegen eines elektrischen Feldes durch die Wanderung der Ampholyte an ihren spezifischen isoelektrischen Punkt. Beim immobilisierten pH-Gradienten sind die bifunktionellen Acrylamidderivate mit verschiedenen puffernden Resten in die Gelmatrix einpolymerisiert (Bjellqvist et al., 1982; Berkelman und Stenstedt, 1998).

4.2.1 Zweidimensionale Auftrennung lysosomaler Membranproteine unter Verwendung von immobilisierten pH-Gradienten beziehungsweise freien Trägerampholyten für die isoelektrische Fokussierung

Im Folgenden sollen die beiden Methoden zur isoelektrischen Fokussierung, Streifengele mit immobilisiertem pH-Gradienten und Röhrchengele mit freien Trägerampholyten, gegenübergestellt werden. Der indirekte Vergleich der beiden Methoden findet im Anschluss an die zweite Dimension, die SDS-Gelelektrophorese, statt. Als Parameter dienen die Auftrennung und die Ausbeute der zweidimensional aufgetrennten lysosomalen Membranproteine.

Die in Abbildung 4.1 dargestellten SDS-Polyacrylamidgele zeigen zweidimensional aufgetrennte, ultrazentrifugierte lysosomale Membranproteine. Zur isoelektrischen Fokussierung der Probe A wurde ein immobilisierter pH-Gradient mit einer Länge von 11 cm, und zur isoelektrischen Fokussierung der Probe B wurde ein Röhrchengel mit Trägerampholyten und einer Länge von 12.5 cm verwendet. Der fokussierte Bereich liegt jeweils in einem Bereich von pH 4.0 bis 7.0. Die Proben A und B wurden bei gleicher Harnstoffkonzentration in unterschiedlichen CHAPS-Konzentrationen lysiert. Nicht dargestellte Ergebnisse zeigen, dass es bei der Verwendung immobilisierter pH-Gradienten zu keiner Verbesserung der Proteinausbeute kommt, wenn die CHAPS-Konzentration von 2 auf 4 % erhöht wird.

Bei identischer Membranpräparation und identischer Proteinmenge zeigen sich deutliche Unterschiede im Proteinmuster der SDS-Polyacrylamidgele 4.1 A und 4.1 B. Diese sind ab einem Molekulargewicht von 30 kDa signifikant. Besonders auffällig sind die Unterschiede im rechten Drittel der beiden SDS-Polyacrylamidgele. Nachdem es sich beim immobilisierten pH-Gradienten laut Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech, 1998) um einen linearen Gradienten von pH 4.0 bis 7.0 handelt, sind somit die deutlichsten Unterschiede in einem Bereich von pH 6.0 bis 7.0 zu erkennen. Zur Unterstützung der beschriebenen Aussagen sind beim SDS-Polyacrylamidgel 4.1 B einige Proteine mit weißen Pfeilspitzen markiert. Diese Proteine sind nicht im SDS-Polyacrylamidgel 4.1 A zu detektieren.

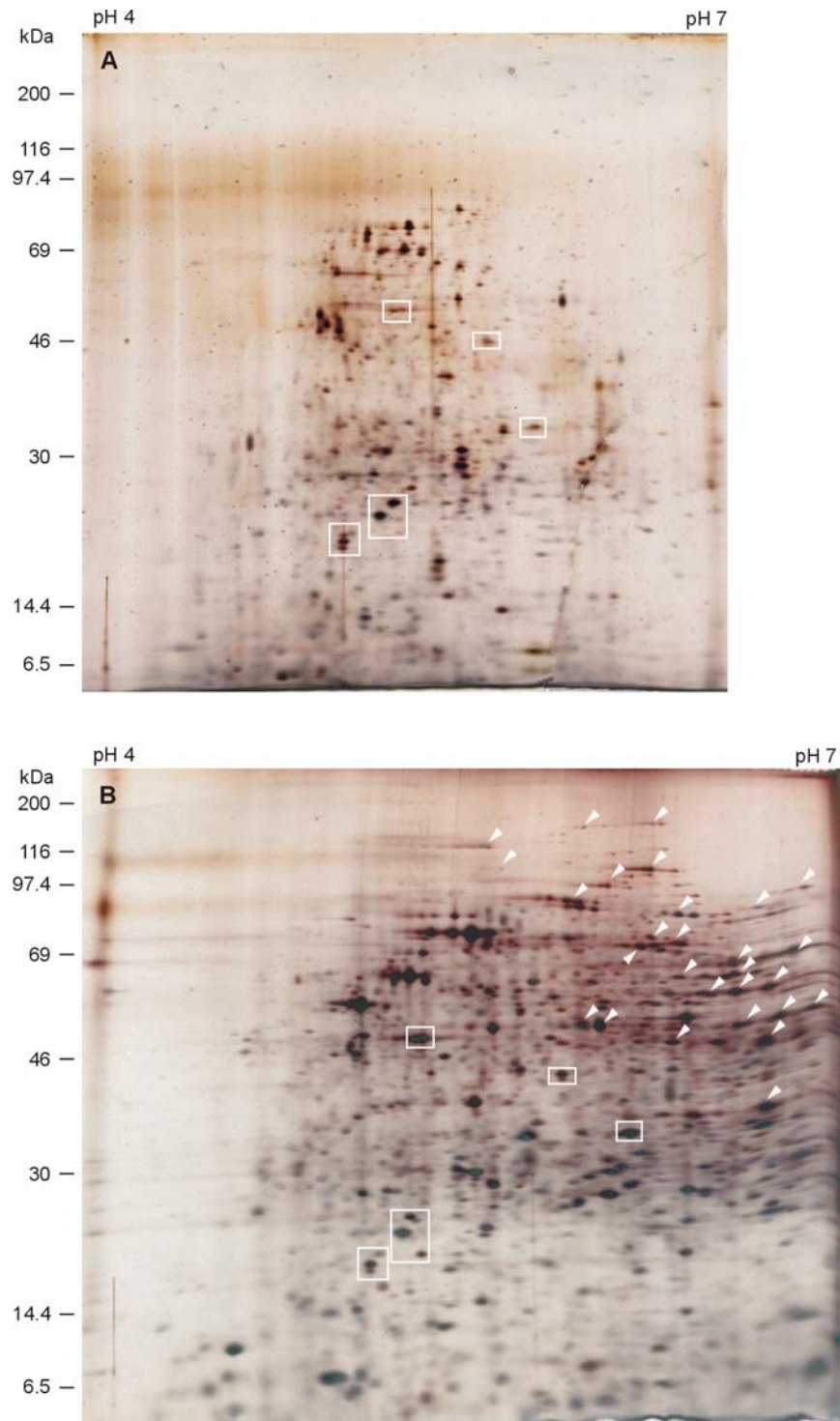


Abb. 4.1: **Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung ultrazentrifugierter lysosomaler Membranproteine.**

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden beim oberen Polyacrylamidgel (A) ein immobilisierter pH-Gradient (IEF-Streifengel) und beim unteren Polyacrylamidgel (B) ein Röhrchengel mit Trägerampholyten verwendet. Die weißen Pfeilspitzen markieren einige der Proteine, die nur im Polyacrylamidgel B zu detektieren sind. Durch die weißen Kästchen werden jeweils identische Proteine markiert.

Pro Gel wurden 25 µg ultrazentrifugierte lysosomale Membranen der gleichen Präparation eingesetzt. Probe A wurde in 2 % [w/v] CHAPS und 9 M Harnstoff und Probe B in 4 % [w/v] CHAPS und 9 M Harnstoff lysiert. Probe A wurde in einem IEF-Streifengel (11 cm lang) und Probe B in einem Röhrchengel (12.5 cm lang) isoelektrisch fokussiert. Anschließend wurden die fokussierten Proben über ein 15.1 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und silbergefärbt.

4.2.1.1 Bestimmung des pH-Wertes fokussierter Röhrchengele mit Trägerampholyten

Im Folgenden soll der pH-Gradient fokussierter Röhrchengele bestimmt werden. Es soll untersucht werden, ob sich ein mit dem fokussierter IEF-Streifengele vergleichbarer linearer pH-Gradient ausbildet.

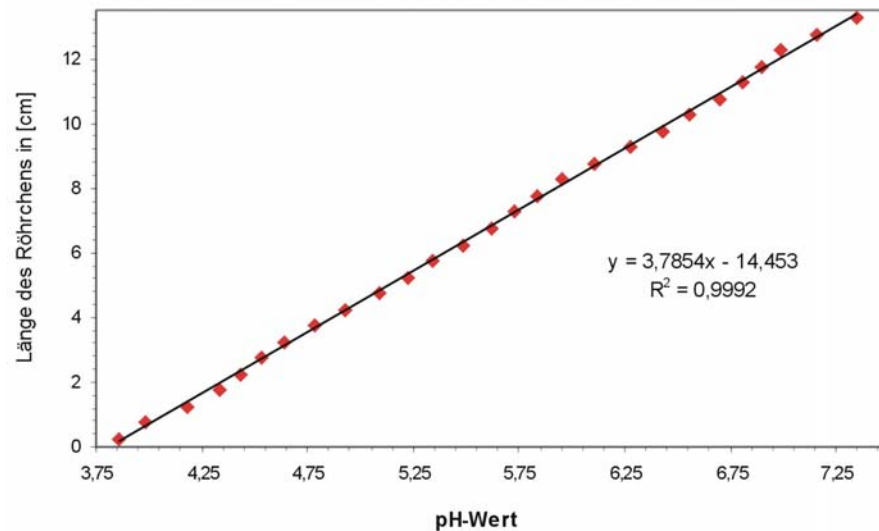


Abb. 4.2: Darstellung des pH-Gradienten eines isoelektrisch fokussierten Röhrchengels (oben) und des entsprechenden zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgels (unten).

Es wurden 25 µg ultrazentrifugiertes lysosomales Membranprotein in 4 % [w/v] CHAPS, 0.5 % [v/v] Nonidet P-40 und 9 M Harnstoff lysiert und isoelektrisch fokussiert. Ein Röhrchengel wurde über ein 15.1 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und silbergefärbt. Ein identisches Röhrchengel wurde nach der Fokussierung in 0.5 cm breite Segmente geschnitten und in ein Reaktionsgefäß mit 400 µL Wasser gegeben. Hieran schloss sich eine mehrstündige Inkubation auf einem so genannten Drehrad bei 4 °C an. Abschließend wurde mit Hilfe einer pH-Elektrode der pH-Wert jeder Probe bestimmt.

Im oberen Teil der Abbildung 4.2 ist die repräsentative positive lineare Beziehung zwischen dem pH-Wert und der Länge des Röhrchengels graphisch dargestellt. Der errechnete Korrelationskoeffizient dieser Beziehung liegt bei 0.998, woraus sich ein Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0.999 ergibt. Durch ein Gleichsetzen der Länge des Röhrchengels mit der Breite des SDS-Polyacrylamidgels sind somit Aussagen bezüglich des isoelektrischen Punktes der zweidimensional aufgetrennten lysosomalen Membranproteine möglich.

Beim Vergleich der beiden getesteten Methoden zur Trennung eines Gemisches lysosomaler Membranproteine zeigt sich, dass durch die isoelektrische Fokussierung in Röhrchengelen mit Trägerampholyten eine deutlich bessere Ausbeute und Auftrennung lysosomaler Membranproteine erzielt werden kann. Besonders signifikant ist dies bei Proteinen mit einem Molekulargewicht höher als 30 kDa und einem isoelektrischen Punkt größer als pH 6.0.

4.2.2 Vergleich zweier Silberfärbemethoden nach Heukeshoven und Dernick (1986; 1988)

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Ergebnisse der zweidimensionalen Gelelektrophorese liegt in der Wahl der entsprechenden Färbemethode. Nach Westermeier (2001) sind zur Zeit über 100 verschiedene Protokolle zur Silberfärbung veröffentlicht.

Es sollen zwei Protokolle von Heukeshoven und Dernick (1988 und 1986) verglichen werden, die sich im Methodischen hauptsächlich in der unterschiedlichen Dauer der Färbung, eineinhalb (1988) im Vergleich zu sechseinhalb Stunden (1986) – zuzüglich einer über Nacht Inkubation – und einer zusätzlichen Fixierung mit Glutardialdehyd (nur 1986) unterscheiden.

In Abbildung 4.3 sind identische zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgele (A und B) dargestellt, die nach unterschiedlichen Protokollen gefärbt wurden. Im rechten Teil des Bildes sind jeweils zweifach vergrößerte Ausschnitte 1 und 2 gezeigt. Die mit 2A und 2B gekennzeichneten Vergrößerungen deuten auf Punktgruppen hin, die unabhängig von der Wahl des Färbeprotokolls gleiche Signalintensitäten aufweisen. Unterschiede sind beim Vergleich der im hochmolekularen Bereich gewählten Ausschnitte 1A und 1B erkennbar. In Abbildung 4.3 A sind keine oder nur schwache Signale erkennbar. Dagegen sind in Abbildung 4.3 B deutliche Punkte zu sehen.

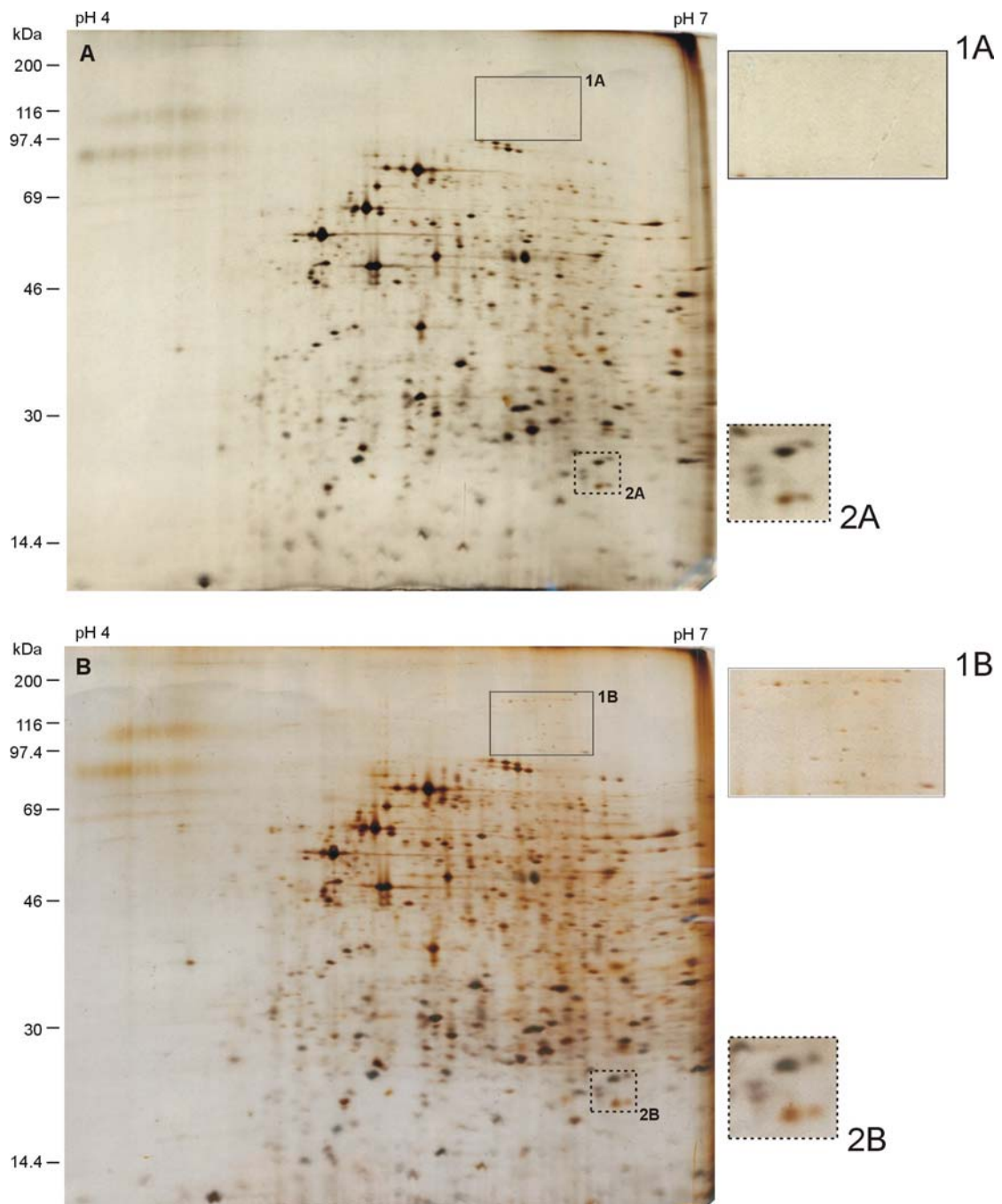


Abb. 4.3: **Vergleich zweier Protokolle zur Silberfärbung von zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen.** A wurde nach Heukeshoven und Dernick 1988 und B nach Heukeshoven und Dernick 1986 gefärbt. Auf der rechten Seite der Abbildung sind die im Silbergel markierten Ausschnitte in zweifacher Vergrößerung dargestellt.

Pro Gel wurden 25 µg ultrazentrifugierte lysosomale Membranen in 4 % [w/v] CHAPS und 9 M Harnstoff lysiert, in Röhrchengelen isoelektrisch fokussiert und anschließend über ein 15.1 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Das obere SDS-Polyacrylamidgel (A) wurde nach dem weniger zeitaufwendigen Protokoll (Heukeshoven und Dernick, 1988) und das untere SDS-Polyacrylamidgel (B) wurde nach dem zeitaufwendigeren Protokoll, ergänzt durch die Fixierung mit Glutardialdehyd (Heukeshoven und Dernick, 1986), gefärbt.

Beide Protokolle zur Silberfärbung von zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen führen zu guten bis sehr guten Ergebnissen, sofern Proteine bis etwa 60 kDa untersucht werden. Der Vergleich der Gesamtzahl der detektierten Proteine zeigt, dass in Abbildung 4.3 B etwa 30 % mehr Proteine zu finden sind als in Abbildung 4.3 A. Je größer das Molekulargewicht, desto größer sind die beschriebenen Unterschiede. Im Bereich von 69 bis 200 kDa liegen die Unterschiede bei etwa 50 %.

Den vorliegenden Ergebnissen folgend, sollten Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht von mehr als 60 kDa nach dem Protokoll von 1986 mit der Glutardialdehyd-Fixierung gefärbt werden.

4.2.3 Auftrennung lysosomaler Membranproteine im präparativen Maßstab

Nachdem es gelungen ist, lysosomale Membranproteine im analytischen Bereich mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung in Röhrchengelen aus Polyacrylamid mit Trägerampholyten und anschließender SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufzutrennen, soll nun versucht werden, präparative Mengen lysosomaler Membranproteine zweidimensional darzustellen.

In Abbildung 4.4 sind zweidimensional aufgetrennte, ultrazentrifugierte lysosomale Membranproteine dargestellt. Im oberen SDS-Polyacrylamidgel (A) werden 25 µg Protein aufgetragen und silbergefärbt. Im unteren SDS-Polyacrylamidgel (B) wird die zehnfache Proteinmenge, also 250 µg lysosomales Membranprotein aufgetragen und mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Die Proben werden in 9 M Harnstoff, 3.5 % [w/v] CHAPS und 0.5 % [w/v] Triton X-100 lysiert. Nicht dargestellte Ergebnisse zeigen, dass bei der Fokussierung präparativer Mengen lysosomalen Membranproteins ein Zusatz von 0.5 % [w/v] eines nicht-ionischen Detergens, z.B. Triton X-100 oder Nonidet P-40, die bei der ausschließlichen Verwendung von CHAPS zu beobachtenden Präzipitationen im sauren Bereich deutlich reduziert werden können. Unabhängig davon führt der Zusatz eines nichtionischen Detergens in der angegebenen Konzentration zu keiner erkennbaren Änderung des zweidimensionalen Proteinmusters.

Die dunklen (roten) Pfeilspitzen in Abbildung 4.4 deuten auf Proteine hin, die in beiden SDS-Polyacrylamidgelen prominent vertreten sind. Im analytischen SDS-Polyacrylamidgel (A) sind einige der Proteine mit weißen Pfeilspitzen markiert, die im präparativen SDS-Polyacrylamidgel (B) nicht oder äußerst schwach zu detektieren sind. Es konnte kein lysosomales Membranprotein ausschließlich im präparativen SDS-Polyacrylamidgel (B) entdeckt werden, so dass angenommen werden kann, dass alle Coomassie-Brilliant-Blau färbbaren lysosomalen Membranproteine auch silberfärbbar sind.

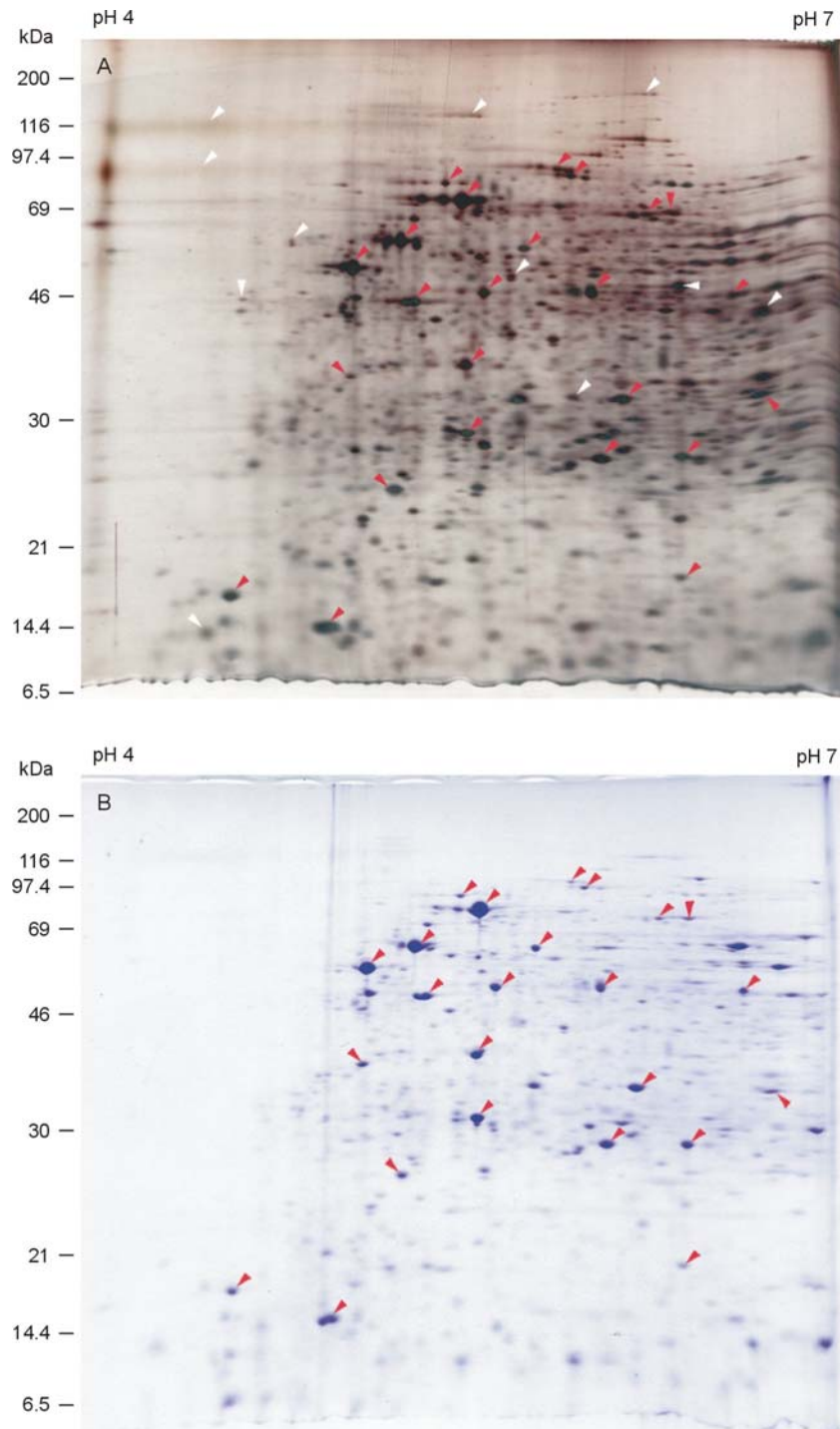


Abb. 4.4: **Zweidimensionale Darstellung ultrazentrifugierter lysosomaler Membranproteine.** Im oberen silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel (A) sind 25 µg und im unteren, Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten, SDS-Polyacrylamidgel (B) sind 250 µg Protein aufgetragen. Die dunkleren Pfeilspitzen deuten auf Proteine hin, die in beiden SDS-Polyacrylamidgelen vergleichbar prominent sind. Die weißen Pfeilspitzen deuten auf Proteine hin, die nur im silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel (A), nicht aber im Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (B) zu detektieren sind.

Es wurden 25 µg (entspricht 0.48 mU saure β-Glucosidase) beziehungsweise 250 µg (entspricht 4.8 mU saure β-Glucosidase) lysosomales, ultrazentrifugiertes Membranprotein in 3.5 % [w/v] CHAPS, 0.5 % [v/v] Triton X-100 und 9 M Harnstoff lysiert, in Röhrchengelen isoelektrisch fokussiert und anschließend über ein 15.1 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das obere SDS-Polyacrylamidgel (A) wurde silbergefärbt und das untere SDS-Polyacrylamidgel (B) wurde Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt.

Die zweidimensionale SDS-Gelelektrophorese unter Verwendung von Röhrchengelen mit Trägerampholyten für die erste Dimension stellt den gezeigten Ergebnissen folgend eine geeignete Methode dar, um größere Mengen lysosomalen Membranproteins für eine weiterführende Charakterisierung aufzutrennen.

4.2.4 Nachweis des lysosomal assoziierten Membranproteins 2 (LAMP-2) im Western-Blot

Nachdem präparative Mengen lysosomalen Membranproteins zweidimensional getrennt werden konnten, soll nun versucht werden, das humane lysosomal assoziierte Membranprotein 2 (LAMP-2) im Western-Blot nachzuweisen und seinen isoelektrischen Punkt zu bestimmen.

Für das Molekulargewicht des humanen LAMP-2 werden in der Literatur verschiedene Angaben gemacht. Es kann je nach Gewebe zwischen 100 bis 120 kDa liegen (Diettrich et al., 1996; Carlsson et al., 1988; Chen et al., 1985). Der isoelektrische Punkt wird mit pH 3.5 bis pH 7.0 (Diettrich et al., 1996) beziehungsweise pH 4.1 bis 5.2 (Chen et al., 1985) angegeben.

In Abbildung 4.5 A ist LAMP-2 im Western-Blot, detektiert mit Hilfe des 2D5-Antikörpers (Radons et al., 1992), dargestellt. Sowohl das Signal auf der linken Seite bei pH 4.2 bis pH 4.6, die Signale bei pH 5.0, 5.2 und 5.3 als auch das Signal auf der rechten Seite bei pH 7.0 werden LAMP-2 zugeordnet. Die Signale auf der linken beziehungsweise rechten Seite sind etwa gleich intensiv. Nach Auswertung des im Anschluss an den Western-Blot silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgels handelt es sich bei den Signalen bei pH 5.0 bis 5.3 um LAMP-2, das aufgrund von Präzipitationen im Röhrchengel nicht weiter bis zu seinem isoelektrischen Punkt wandern konnte. Das Signal bei pH 7.0 ist auf LAMP-2 zurückzuführen, das nicht in das Röhrchengel eingewandert ist, also nicht isoelektrisch fokussiert wird, und am Probenauftragungspunkt „liegendeblieben“ ist. Unabhängig vom isoelektrischen Punkt liegt das apparente Molekulargewicht des aus humaner Plazenta isolierten LAMP-2 bei 100 bis 110 kDa.

In Abbildung 4.5 B ist ein der Probe des Western-Blot vergleichbares silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel dargestellt. Hier wird unter sonst identischen Versuchsbedingungen ein Zehntel des Proteins aufgetragen. Das bei einem apparenten Molekulargewicht von 100 bis 110 kDa detektierbare Protein auf der linken Seite des SDS-Polyacrylamidgels zeigt von pH 4.0 bis pH 5.4 ein Signal unterschiedlicher Intensität. Das deutlich stärkste Signal ist in einem Bereich von pH 4.2 bis pH 4.7 erkennbar. Nachdem nur 50 µg lysosomalen Membranproteins aufgetragen wurde, kommt es nicht zu den im Western-Blot nachgewiesenen Präzipitationen.

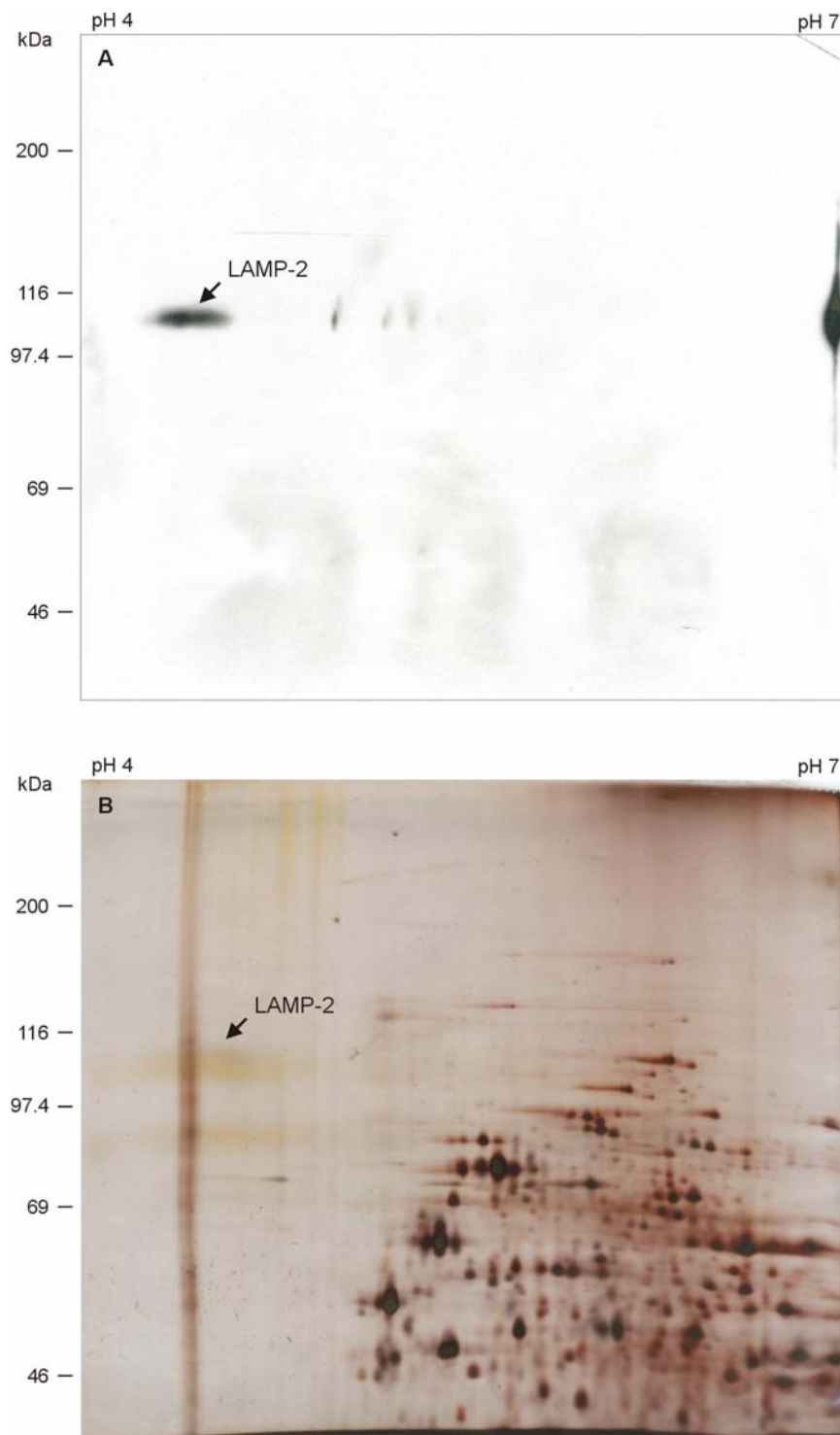


Abb. 4.5: **Nachweis des lysosomal assoziierten Membranproteins (LAMP-2) im Western-Blot (ECL-Nachweis in Teil A) und daraus folgende Zuordnung des Proteins im silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel (Teil B).**

Es wurden 500 µg beziehungsweise 50 µg lysosomales, ultrazentrifugiertes Membranprotein in 4 % [w/v] CHAPS, 0.5 % [v/v] Nonidet P-40 und 9 M Harnstoff lysiert, in Röhrchengelen isoelektrisch fokussiert und anschließend über ein 8.0 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das SDS-Polyacrylamidgel mit 500 µg lysosomalem Membranprotein wurde auf eine PVDF-Membran geblottet. Für die anschließende Immundetektion wurden der 2D5-Antikörper und der Meerrettichperoxidase gekoppelte Ziege-gegen-Kaninchen Antikörper 1:4000 verdünnt. Die Visualisierung erfolgte mittels ECL. Das SDS-Polyacrylamidgel mit 50 µg lysosomalen Membranproteins wurde silbergefärbt.

Folglich weist das aus humaner Plazenta isolierte LAMP-2 ein apparentes Molekulargewicht von 100 bis 110 kDa und einen isoelektrischen Punkt von pH 4.2 bis 4.6 beziehungsweise 4.7 auf. Weiterführende Betrachtungen zeigen, dass es ab einer bestimmten Proteinmenge nicht mehr möglich ist, den überwiegenden Teil dieses Proteins „in Lösung“ zu halten, so dass am Auftragspunkt ein deutlicher Niederschlag erkennbar ist.

4.2.5 Zweidimensionaler Vergleich ultrazentrifugierter und immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine

In Kapitel 4.1 werden ultrazentrifugierte und immunoaffinitätsgereinigte lysosomale Membranpräparationen hinsichtlich der lysosomalen Markerenzyme β -Hexosaminidase und saure β -Glucosidase untersucht. Die entsprechenden zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgele sind in Abbildung 4.6 A und 4.6 B dargestellt. Ein vergleichbares Grundmuster ist erkennbar.

Einige der identischen Punkte oder Punktgruppen sind mit Zahlen von 1 bis 51 nummeriert. Durch die Immunoaffinitätsreinigung (Abbildung 4.6 B) kommt es im Vergleich zur Ultrazentrifugation (Abbildung 4.6 A) lysosomaler Membranen zu einer relativen Anreicherung der Proteine oder Proteingruppen 1, 2, 8, 45, 46 und 50. Im Gegensatz dazu sind die Signale der Proteine oder Proteingruppen 10, 15, 16, 22, 25, 31, 43 und 49 der ultrazentrifugierten Membranen relativ stärker als bei den immunoaffinitätsgereinigten Membranen. Die mit I bis IX nummerierten Proteine in Abbildung 4.6 B sind nur hier, bei den immunoaffinitätsgereinigten Membranen zu detektieren. Unterschiede sind ebenfalls bei der Gesamtzahl der detektierbaren Proteine zu erkennen. In Abbildung 4.6 A, den ultrazentrifugierten Membranen, beträgt diese Zahl etwa 800 und in Abbildung 4.6 B, den immunoaffinitätsgereinigten Membranen, etwa 500.

Wie bereits beschrieben wurde, kommt es durch die Immunoaffinitätsreinigung zu einer Anreicherung des Protein 1, dem als LAMP-2 identifizierten Protein. Dies wird als Hinweis dafür gewertet, dass es sich bei den immunoaffinitätsgereinigten lysosomalen Membranen um die im Vergleich zu den ultrazentrifugierten Membranen „sauberere“ Membranpräparation handelt. Eine Aussage, die durch die 3.8-fache Anreicherung der (mit der lysosomalen Membran assoziierten) sauren β -Glucosidase gestützt wird (siehe Kapitel 4.1). Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei den in Abbildung 4.6 B dargestellten immunoaffinitätsgereinigten Proteinen um Membranproteine mit einer geringen Kontamination durch Proteine anderer Organellen oder der lysosomalen Matrix handelt.

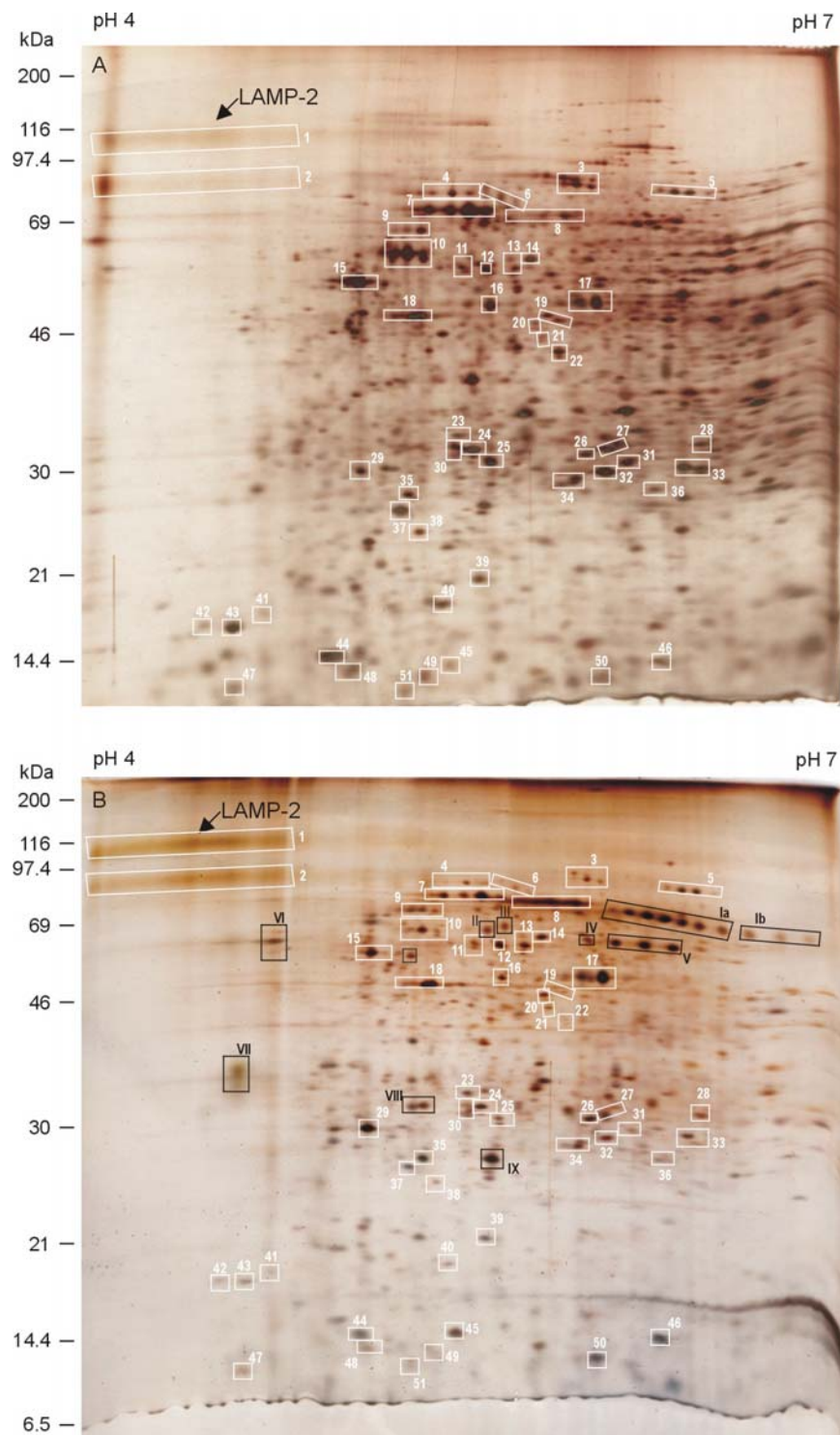


Abb. 4.6: **Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung ultrazentrifugierter (Bild A) und immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine (Bild B).** Einige Proteine oder Proteingruppen, die in beiden Bildern (A und B) vorkommen, sind mit Zahlen von 1 bis 51 nummeriert. Einige Proteine oder Proteingruppen, die nur bei den immunoaffinitätsgereinigten Membranen (Bild B) zu detektieren sind, tragen römische Ziffern von I bis IX.

25 µg ultrazentrifugierte beziehungsweise immunoaffinitätsgereinigte lysosomale Membranproteine wurden in 9 M Harnstoff und 4 % [w/v] CHAPS lysiert, in Röhrchengelen isoelektrisch fokussiert, über ein 15.1 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel getrennt und silbergefärbt.

4.2.6 Natriumcarbonat-Behandlung

Es ist bekannt, dass mit Hilfe einer Natriumcarbonat-Behandlung lösliche und periphere Membranproteine von integralen Membranproteinen abgelöst werden können (Fujiki, 1982a). Membranassoziierte Proteine werden über Ionenbindungen oder andere schwache Wechselwirkungen an die Membran gebunden. Aus diesem Grund soll zur Charakterisierung lysosomaler Membranproteine hinsichtlich der eben beschriebenen physikalischen Eigenschaften eine Natriumcarbonat-Behandlung durchgeführt werden.

4.2.6.1 Enzymatische Charakterisierung lysosomaler Membranproteine nach Natriumcarbonat-Behandlung

Die Aktivität der Acetyl-Coenzym A: α -Glucosaminid *N*-Acetyltransferase (EC 2.3.1.78) (*N*-Acetyltransferase) wird als enzymatischer Marker für lysosomale Membranproteine bestimmt. Die Wiederfindungsrate dieser *N*-Acetyltransferase im Anschluss an die Natriumcarbonat-Behandlung ist sowohl bei den ultrazentrifugierten als auch bei den immunoaffinitätsgereinigten lysosomalen Proben (Niederschlag zuzüglich Überstand) vollständig. Hierdurch wird unter anderem gezeigt, dass die *N*-Acetyltransferase im alkalischen Milieu (etwa pH 11.5), das im Verlauf der Natriumcarbonat-Behandlung vorliegt, stabil ist. Bei beiden Membranpräparationen wird im Anschluss an die alkalische Behandlung der überwiegende Teil der Enzymaktivität im Niederschlag gefunden. In den immunoaffinitätsgereinigten Membranen wird die Ausgangsaktivität vollständig und in den ultrazentrifugierten Membranen etwa zu 80 % im Sediment gemessen. Die Tatsache, dass bei den ultrazentrifugierten Membranen der überwiegende Teil und bei den immunoaffinitätsgereinigten Membranen die gesamte Aktivität der *N*-Acetyltransferase im Niederschlag nachgewiesen wird, führt zu dem Schluss, dass es sich bei diesem Enzym um ein integriertes lysosomales Membranprotein handelt.

Eine enzymatische Bestimmung der sauren β -Glucosidase ist nicht möglich, da die Natriumcarbonat-Behandlung zu hohen Aktivitätsverlusten führt, die weit über 80 % liegen.

4.2.6.2 Zweidimensionale Darstellung der lysosomalen Membranproteine im Anschluss an eine Natriumcarbonat-Behandlung

Die lysosomalen Proteine im Niederschlag beziehungsweise im Überstand sollen mit Hilfe silbergefärbter zweidimensionaler SDS-Polyacrylamidgele dargestellt werden.

Der Vergleich der Punktmuster der in Abbildung 4.7 dargestellten SDS-Polyacrylamidgele zeigt, dass etwa 90 % der Proteine sedimentierbar und demzufolge im Niederschlag (oberes Gel) nachzuweisen sind. Schätzungsweise 10 % der Proteine der lysosomalen Membran befinden sich im Anschluss an die Natriumcarbonat-Behandlung im Überstand (unteres Gel). Unter den detektierbaren Proteinen kann keines nachgewiesen werden, das ausschließlich im Überstand zu finden ist.

Mit weißen Pfeilspitzen sind in Abbildung 4.7 N einige der Proteine markiert, die nur im Niederschlag zu erkennen sind. Zu diesen sedimentierten Proteinen zählt auch LAMP-2. Diese Proteine haben einen isoelektrischen Punkt von pH 4.0 bis 7.0 und liegen in einem Molekulargewichtsbereich von etwa 10 bis über 200 kDa.

Bei den mit schwarzen Pfeilspitzen markierten Punkten handelt es sich um Proteine, die sowohl im Niederschlag (Abbildung 4.7 N) als auch im Überstand (Abbildung 4.7 Ü) vorkommen. Unterschiede der Signalintensität werden nicht berücksichtigt. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei den mit schwarzen Pfeilspitzen markierten Proteinen um periphere lysosomale Membranproteine handelt. Der überwiegende Teil dieser Proteine liegt in einem Molekulargewichtsbereich von etwa 20 bis 90 kDa und hat einen isoelektrischen Punkt von pH 5.0 bis 7.0.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es sich bei den immunoaffinitätsgereinigten lysosomalen Membranproteinen zu einem überwiegenden Teil um integrale Membranproteine und nur zu einem geringen Teil um periphere Membranproteine handelt.

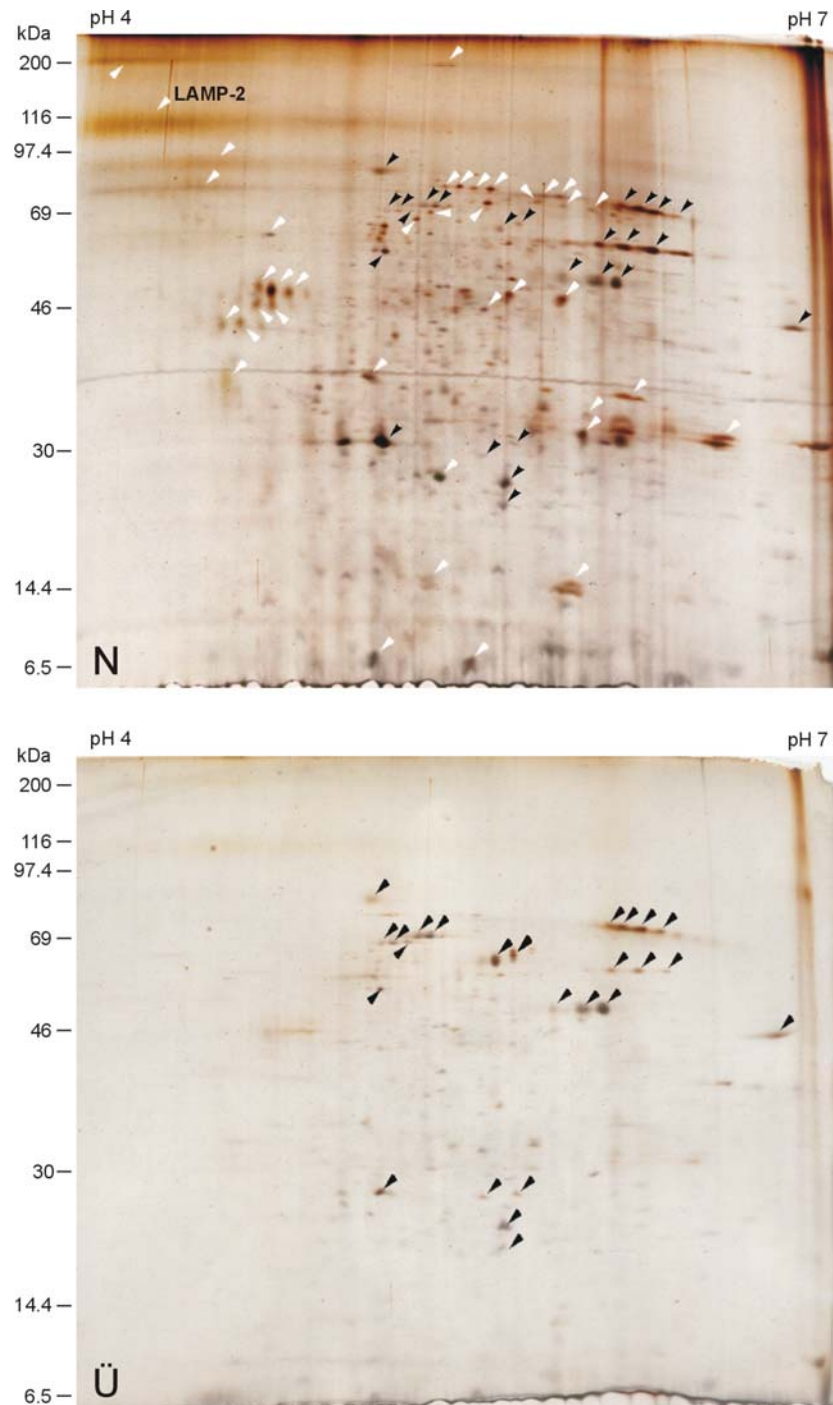


Abb. 4.7: **Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung lysosomaler Membranproteine nach einer Natriumcarbonat-Behandlung.** Im oberen silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel ist der Niederschlag (N) und im unteren der Überstand (Ü) dargestellt. Die schwarzen Pfeilspitzen markieren Proteine, die sowohl im Überstand als auch im Niederschlag zu detektieren sind. Die weißen Pfeilspitzen deuten auf Proteine hin, die nur im Niederschlag vorkommen.

50 µg immunoaffinitätsgereinigte lysosomale Membranproteine mit einer β -Glucosidaseaktivität von 3.9 mU wurden einer 30-minütigen Natriumcarbonat-Behandlung auf Eis unterzogen. Darauf folgte die sofortige Neutralisation der Probe und die anschließende einstündige Ultrazentrifugation bei 50 000 Umdrehungen pro Minute ($265\,205 \times g_{\max}$). Der Überstand und der von den C1Z-Perlen abgelöste Niederschlag wurden über Nacht mit Aceton gefällt. Die Niederschläge wurden in 9 M Harnstoff und 4 % [w/v] CHAPS lysiert, in Röhrchengelen isoelektrisch fokussiert, über ein 15.1 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel getrennt und silbergefärbt.

4.2.7 Deglykosylierung lysosomaler Membranproteine

Bei den bisher isolierten und charakterisierten lysosomalen Membranproteinen handelt es sich um stark glykosylierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 bis 120 kDa (Hunziker und Geuze, 1996). Es werden lysosomale Membranproteine mit N-Glykanen, das heißt mit an Asparagin gebundenen Oligosaccharidseitenketten (Carlsson et al., 1988), und N-Acetylneuraminsäurerestetragende Membranproteine (Lewis et al., 1985) beschrieben.

Die folgende Behandlung der immunoaffinitätsgereinigten lysosomalen Membranproteine mit einem N-Acetylneuraminsäurerest (Neuraminsäurerest) oder/und einem N-Glykane spaltenden Enzym sollen Aussagen über die Eigenschaften der dargestellten lysosomalen Membranproteine hinsichtlich ihrer Glykosylierung ermöglichen. Auftrennung und Darstellung erfolgt mittels zweidimensionaler Elektrophorese.

4.2.7.1 Enzymatische Spaltung Asparagin-gebundener N-Glykane

Das Peptid-N⁴-N-(Acetyl- β -GlucosaminyI) Asparagin Amidase (Peptid N-Glycosidase F beziehungsweise PNGase F; EC. 3.2.2.18) aus *Flavobacterium meningosepticum* (Boehringer Mannheim, Mannheim), das zuerst von Plummer et al. (1984) beschrieben wurde, spaltet sämtliche Typen Asparagin-gebundener N-Glykane vom Proteinrückgrat ab (Hinweis des Herstellers; Boehringer Mannheim, Mannheim).

In Abbildung 4.8 sind immunoaffinitätsgereinigte lysosomale Membranproteine nach einer Inkubation mit (4.8 B) und ohne Peptid N-Glycosidase F (4.8 A) dargestellt. Im silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel A der Abbildung 4.8 sind Proteine mit einer weißen Pfeilspitze markiert, die im Anschluss an den Peptid N-Glycosidase F-Verdau nicht mehr an ihrer ursprünglichen Position detektierbar sind. Die markierten Membranproteine liegen in einem Molekulargewichtsbereich von etwa 25 bis über 200 kDa. Ihre isoelektrischen Punkte liegen bei Werten von pH 4.0 bis 5.0 beziehungsweise pH 6.0 bis 7.0, also im silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel B (unteres Bild).

Mit schwarzen Pfeilspitzen sind in Abbildung 4.8 B Proteine markiert, die nach dem Peptid N-Glycosidase F-Verdau im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 4.8 A) hinzugekommen sind. Die gekennzeichneten Proteine haben ein Molekulargewicht von 18 bis etwa 90 kDa. Die isoelektrischen Punkte liegen zwischen pH 4.8 bis pH 7.0.

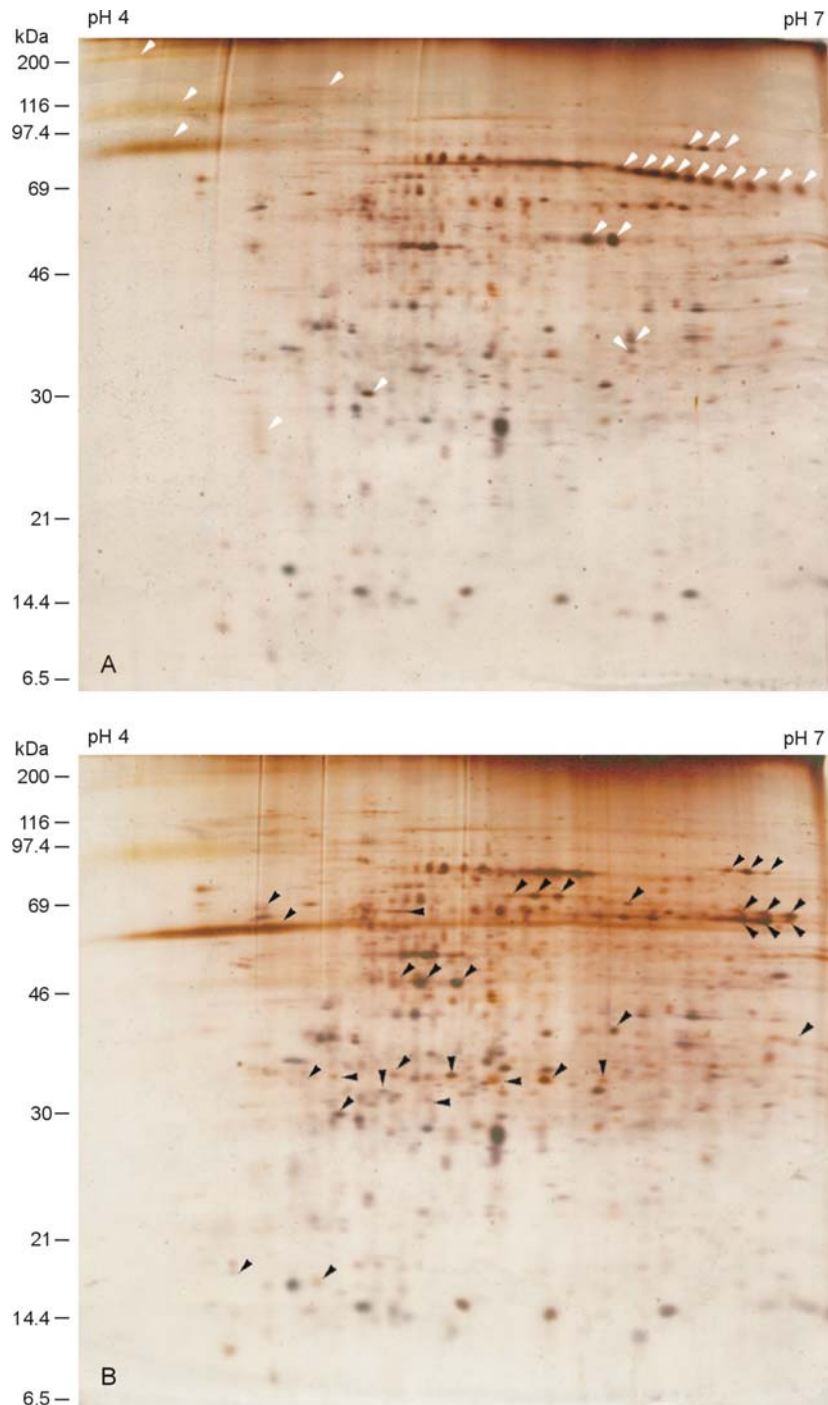


Abb. 4.8: **Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine nach einer vierstündigen Inkubation bei 37 °C ohne (Bild A) und mit Zusatz von Peptid N-Glycosidase F (Bild B).** Die mit weißen Pfeilspitzen markierten Proteine in Bild A deuten auf Proteine hin, die Peptid N-Glycosidase F spaltbar sind, das heißt Asparagin gebundene Oligosaccharidseitenketten tragen. Die mit schwarzen Pfeilspitzen markierten Proteine in Bild B zeigen auf Proteine, die im Anschluss an die Deglykosylierung neu auftreten.

25 µg immunoaffinitätsgereinigtes lysosomales Membranprotein mit einer β -Glucosidaseaktivität von 1.43 mU wurde im entsprechenden Probenpuffer 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Hieran schloss sich nach Zugabe von 0.01 Einheiten Peptid N-Glycosidase F eine vierstündige Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37 °C an.

Die Niederschläge wurden in 9 M Harnstoff, 4 % [w/v] CHAPS und 0.5 % [w/v] Nonidet P-40 lysiert, in Röhrengelen isoelektrisch fokussiert, über ein 15.1 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel getrennt und silbergefärbt.

Den 23 Peptid N-Glycosidase F sensitiven Membranproteinen (Abbildung 4.8 A, weiße Pfeilspitzen) stehen 33 Membranproteine (Abbildung 4.8 B, schwarze Pfeilspitzen) gegenüber, deren Position im zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgel durch die enzymatische Behandlung verändert worden ist.

4.2.7.2 Enzymatische Spaltung von N-Acetylneuraminsäureresten

Die Neuraminidase (Sialidase) aus *Vibrio cholerae* (Boehringer Mannheim, Mannheim) hydrolysiert endständige N- oder O-N-Acetylneuraminsäurereste (Sialinsäuren) (Hinweis des Herstellers; Boehringer Mannheim, Mannheim).

In Abbildung 4.9 sind immunoaffinitätsgereinigte lysosomale Membranproteine im Anschluss an eine Inkubation mit (Abbildung 4.9. B) und ohne Neuraminidase (Abbildung 4.9 A) dargestellt. Die Neuraminidasebehandlung der immunoaffinitätsgereinigten lysosomalen Membranproteine führt zum „Verschwinden“ der in Abbildung 4.9 A mit weißen Pfeilspitzen markierten Proteine. Daraus folgend befinden sich Neuraminsäurereste tragende Membranproteine zu über 90 % in einem Molekulargewichtsbereich von 40 bis 120 kDa. Die Glykoproteine verteilen sich auf den gesamten isoelektrisch fokussierten Bereich von pH 4.0 bis 7.0.

Im Teil B der Abbildung 4.9 sind die Membranproteine mit einer schwarzen Pfeilspitze markiert, die nach der Neuraminidasebehandlung im Vergleich zum Kontrollgel 4.9 A zusätzlich detektiert werden können. Ein Teil der desialysierten Proteine ist in einem Molekulargewichtsbereich von 80 bis über 200 kDa, der andere Teil in einem von 35 bis 46 kDa zu detektieren. Die isoelektrischen Punkte der hochmolekularen Proteine liegen, mit einer Ausnahme, in einem Bereich von pH 5.4 bis 7.0 und die der anderen Proteine, Molekulargewicht von 35 bis 46 kDa, in einem Bereich von pH 4.8 bis 6.2.

Die Anzahl der Neuraminidase empfindlichen Membranproteine (Abbildung 4.9 A, weiße Pfeilspitzen) ist mit 48 fast doppelt so hoch, wie die Zahl der Membranproteine, die im Anschluss an die Neuraminidasebehandlung neu auftreten (Abbildung 4.9 B, schwarze Pfeilspitzen). Ihre Zahl liegt bei 28.

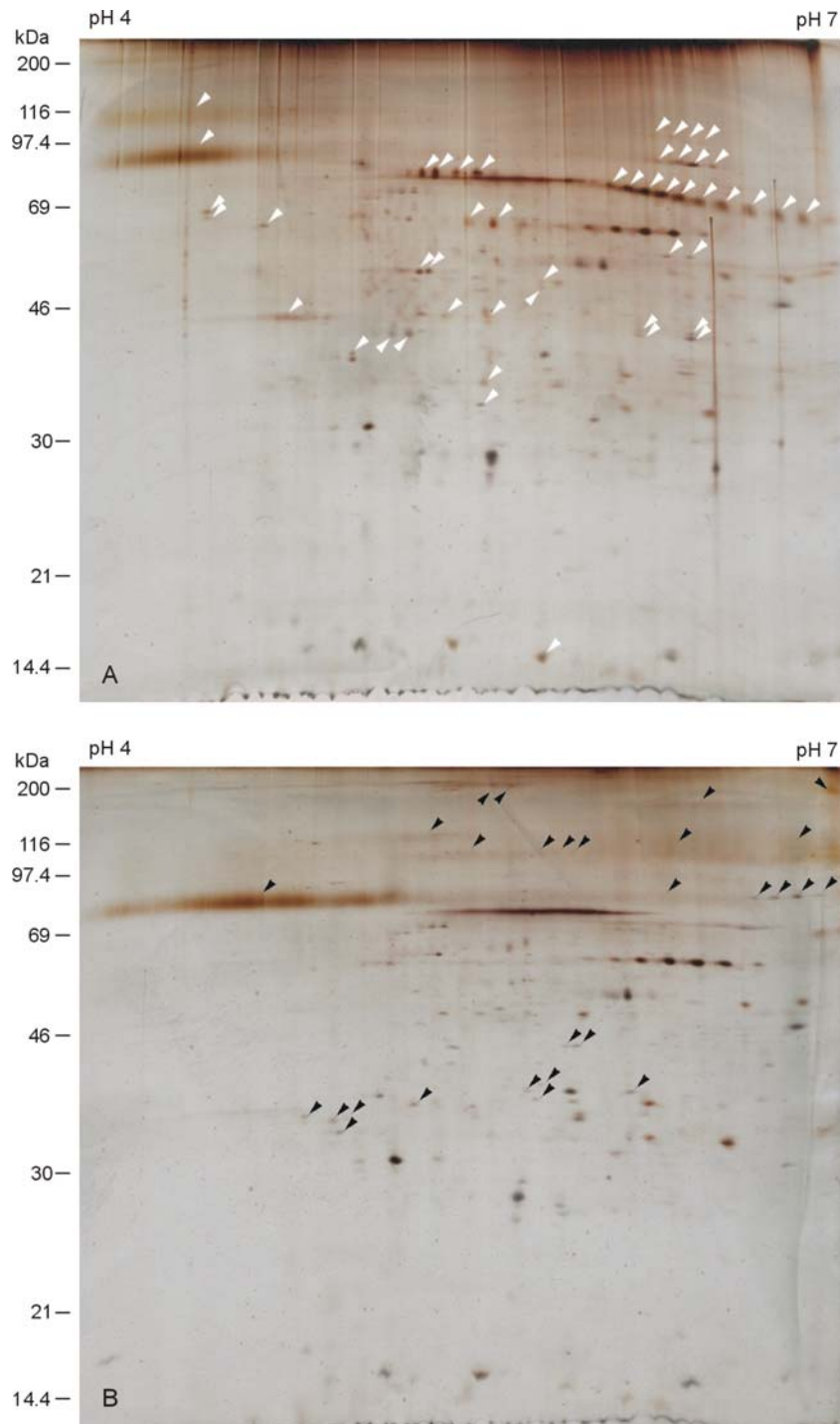


Abb. 4.9: **Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine ohne Behandlung mit Neuraminidase (Bild A) und mit Neuraminidasebehandlung (Bild B).** Die weißen Pfeilspitzen in Bild A deuten auf Proteine hin, die durch die Enzymbehandlung verschwinden, also Neuraminsäurereste tragen. Die schwarzen Pfeilspitzen in Bild B zeigen auf Proteine, die im Anschluss an die Neuraminidasebehandlung neu auftreten.

Zu 25 µg immunoaffinitätsgereinigtem lysosomalen Membranprotein mit einer β -Glucosidaseaktivität von 1.15 mU wurden Proteinaseinhibitoren und 0.5 mU Neuraminidase zugegeben, mit dem gleichen Volumen des zweifachkonzentrierten Neuraminidasepuffers gemischt und anschließend 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der solubilisierte Überstand wurde mit Aceton gefällt, die Niederschläge in 9 M Harnstoff, 4 % [w/v] CHAPS und 0.5 % [w/v] Nonidet P-40 lysiert, in Röhrchengelen isoelektrisch fokussiert, über ein 15.1 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel getrennt und silbergefärbt.

4.2.7.3 Aufeinanderfolgende Spaltung von N-Acetylneuraminsäureresten und N-gebundener Oligosaccharidseitenketten

In voneinander unabhängigen Versuchen ist es gelungen Neuraminsäurereste und N-Glykane von lysosomalen Membranproteinen abzuspalten. Auf diese Ergebnisse aufbauend soll nun eine weitgehende Deglykosylierung der lysosomalen Membranproteine durchgeführt werden. Hierfür wird sich an die Spaltung der Neuraminsäurereste eine Behandlung mit Peptid N-Glycosidase F anschließen.

In Abbildung 4.10 sind lysosomale Membranproteine ohne enzymatische Behandlung (4.10 A) und im Anschluss an eine hintereinander durchgeführte Inkubation mit Neuraminidase und Peptid N-Glycosidase F (4.10 B) dargestellt. In Abbildung 4.10 A sind mit weißen Pfeilspitzen die Proteine markiert, die im Anschluss an die Deglykosylierung nicht mehr detektierbar sind und daraus folgend Neuraminsäurereste oder/und mit Asparagin verknüpfte Oligosaccharidseitenketten tragen. Diese Membranproteine haben vor dem enzymatischen Verdau ein Molekulargewicht von etwa 31 bis über 200 kDa. Die isoelektrischen Punkte liegen in einem Bereich von pH 4.0 bis 7.0.

Im unteren Teil der Abbildung (4.10 B) sind die unter den vorgegebenen Bedingungen deglykosylierten Membranproteine dargestellt. Mit schwarzen Pfeilspitzen sind Proteine markiert, die im Vergleich zum Kontrollgel (4.10 A) zusätzlich detektierbar sind. Es handelt sich um Membranproteine, die Neuraminsäurereste oder/und an Asparagin gebundene Oligosaccharidseitenketten tragen. Diese Proteine liegen in einem Molekulargewichtsbereich von etwa 23 bis 150 kDa mit einem isoelektrischen Punkt von pH 4.0 bis 7.0.

Den 58 deglykosylierbaren lysosomalen Membranproteinen (Abbildung 4.10 A, weiße Pfeilspitzen) stehen 36 deglykosylierte lysosomale Membranproteine (Abbildung 4.10 B, schwarze Pfeilspitzen) gegenüber. Dieses Verhältnis ist mit dem in Kapitel 4.2.7.2 im Anschluss an den Neuraminidaseverdau beschriebenen Ergebnis vergleichbar.

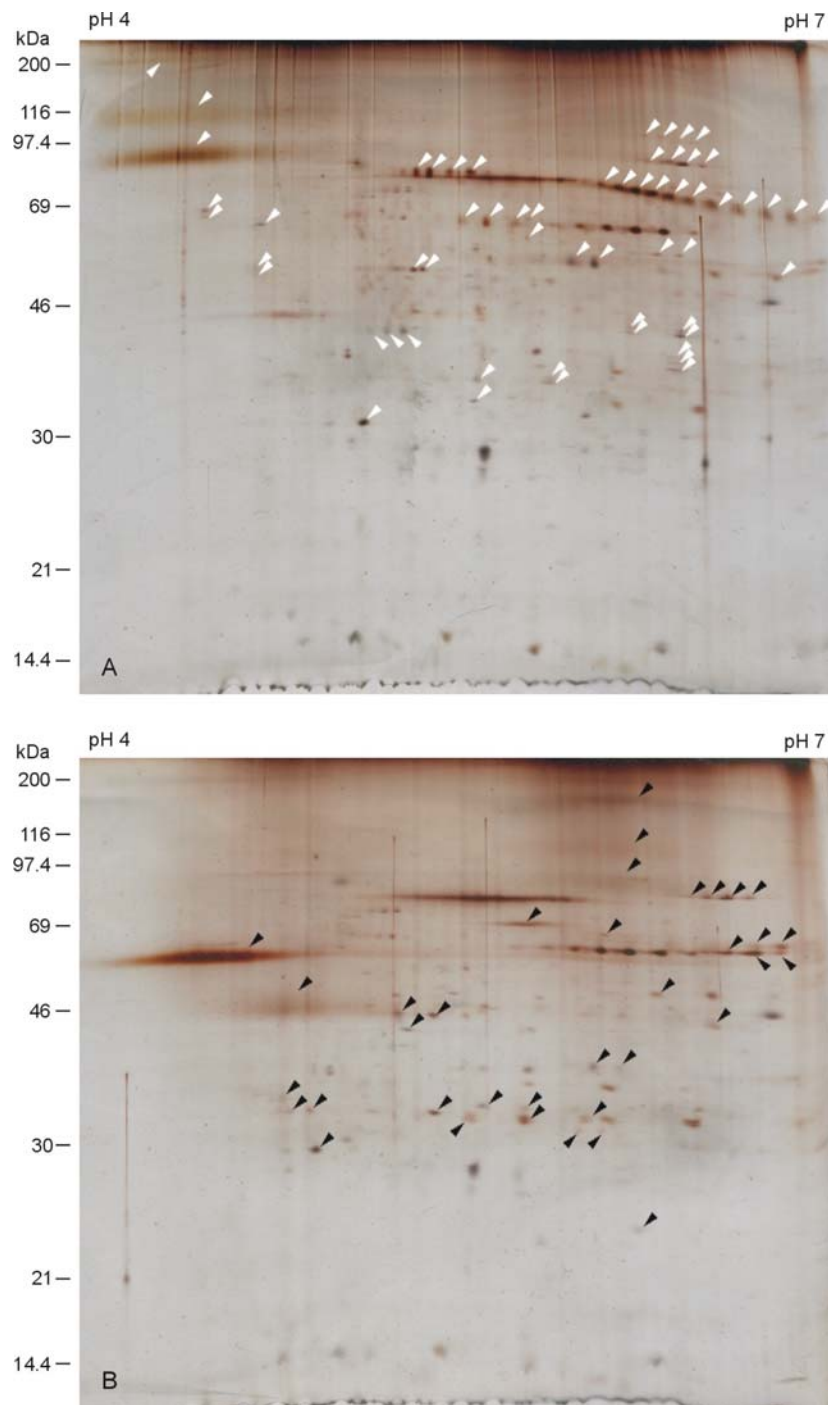


Abb. 4.10: **Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine ohne Behandlung mit Neuraminidase und Peptid N-Glycosidase F (Bild A) und mit Neuraminidase- und Peptid N-Glycosidase F-Behandlung (Bild B).** Die weißen Pfeilspitzen in Bild A deuten auf Proteine hin, die durch die Enzymbehandlungen verschwinden, also Neuraminsäurereste und/oder an Asparagin gebundene Oligosaccharidseitenketten tragen. Die schwarzen Pfeilspitzen in Bild B zeigen auf Proteine, die im Anschluss an die Neuraminidase- und Peptid N-Glycosidase F-Behandlung neu auftreten.

25 µg immunoaffinitätsgereinigtes lysosomales Membranprotein mit einer β -Glucosidaseaktivität von 1.15 mU wurde mit 0.5 mU Neuraminidase behandelt und anschließend mit Aceton gefällt. Der Niederschlag wurde in Peptid N-Glycosidase F Inkubationspuffer gelöst und 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Nach Zugabe 0.01 Einheiten Peptid N-Glycosidase F folgte eine vierstündige Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37 °C. Die Proben wurden in 9 M Harnstoff, 4 % [w/v] CHAPS und 0.5 % [w/v] Nonidet P-40 lysiert, in Röhrengelen isoelektrisch fokussiert, über ein 15.1 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel getrennt und silbergefärbt.

4.2.8 Charakterisierung des Proteoms der lysosomalen Membranproteine

Im Folgenden sollen die bisher beschriebenen Ergebnisse bezüglich der Charakterisierung des Proteoms der lysosomalen Membranproteine zusammengefasst werden. Grundlage sind ihr Verhalten im Anschluss an die Natriumcarbonat-Behandlung und ihre Glykosylierung. Die aufgrund dieser Eigenschaften zu beschreibenden lysosomalen Membranproteine werden in Abbildung 4.11 mit Zahlen von 1 bis 41 nummeriert und sind in Tabelle 4.2 aufgelistet. Es werden Aussagen bezüglich des Molekulargewichtes (MW), des isoelektrischen Punktes (pI), des Verhaltens im Anschluss an die Natriumcarbonat-Behandlung und die Deglykosylierbarkeit durch die Neuraminidase beziehungsweise Peptid N-Glycosidase F getroffen.

Die Proteine beziehungsweise Proteingruppen 1-3, 5-17, 20-37 und 41 tragen Neuraminsäurereste und 1-3, 6, 7, 10-13, 18, 19, 22, 32, 33, 36 und 37 N-Glykane. Sowohl durch Neuraminidase als auch durch Peptid N-Glycosidase F spaltbar sind die Proteine oder Proteingruppen 1-3, 6, 7, 10-13, 22, 32, 33, 36 und 37. Ausschließlich durch Neuraminidase spaltbar sind die Proteine 5, 8, 9, 14-17, 20, 21, 23-31, 34, 35 und 41. Die Proteine 18 und 19 sind nur Peptid N-Glycosidase F sensitiv.

Die Proteine oder Proteingruppen 1, 2, 6, 8-10, 13, 20, 21, 25, 34-38 und 41 sind im Anschluss an die Natriumcarbonat-Behandlung im Niederschlag zu detektieren, tragen Neuraminsäurereste oder/und an Asparagin gebundene Oligosaccharidseitenketten. Daraus folgend werden sie als glykosylierte lysosomale Membranproteine bezeichnet. Es können jedoch keine Aussagen darüber getroffen werden, ob es sich um Transmembranproteine oder um membranassoziierte Proteine mit starker ionischer Wechselwirkung handelt.

Die Nummer 2, das in dieser Arbeit nachgewiesene LAMP-2, hat ein apparantes Molekulargewicht von 100 bis 110 kDa, einen isoelektrischen Punkt von 4.2 bis 4.7 und ist im Anschluss an die Natriumcarbonat-Behandlung im Niederschlag zu finden. Ferner können die in der Literatur (Fukuda, 1991; Carlsson et al., 1988) beschriebenen Eigenschaften bezüglich der Glykosylierung bestätigt werden. LAMP-2 trägt sowohl Neuraminsäurereste als auch N-Glykane.

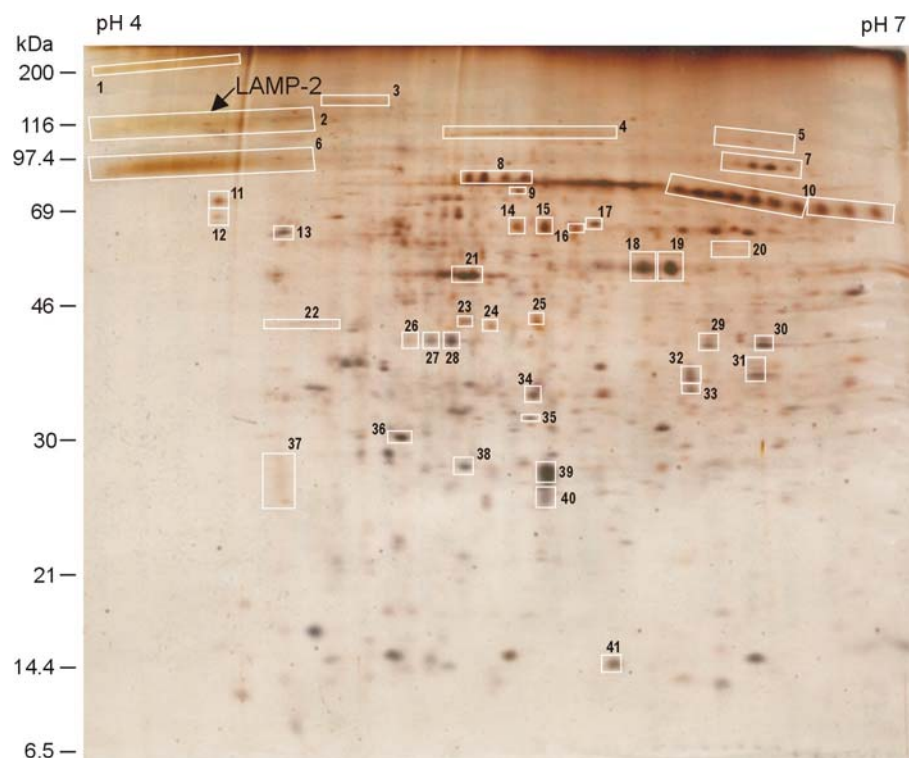


Abb. 4.11: **Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine.** Mit Zahlen von 1 bis 41 sind Proteine oder Proteingruppen markiert, die Neuraminsäurereste tragen oder an Asparagin gebundene Oligosaccharidseitenketten besitzen.

Tab. 4.2: **Auflistung und zusammengefasste Charakterisierung der in Abbildung 4.11 hervorgehobenen immunoaffinitätsgereinigten lysosomalen Membranproteine hinsichtlich ihres apparenten Molekulargewichts (MW), des apparenten isoelektrischen Punktes (pI), des Verhaltens nach der Behandlung mit Natriumcarbonat und der Deglykosylierung mit Hilfe der Neuraminidase beziehungsweise der Peptid-N⁴-N-(Acetyl- β -Glucosaminy) Asparagin Amidase (PNGase F).**

Nummer	apparentes MW	apparenter pI	Natriumcarbonatbehandlung		Deglykosylierbar durch	
			Niederschlag	Überstand	Neuraminidase	PNGase F
1		4.0 - 4.3	+	-	⊗	+
2	110 - 120	4.2 - 4.7	+	-	+	+
3	136	4.9 - 5.1	⊗	⊗	⊗	+
4	103	4.75 - 5.9	⊗	⊗	-	-
5	101/.../ 103	6.3/.../ 6.5	⊗	⊗	+	-
6	87 - 93	4.1 - 4.8	+	-	+	+
7	85/.../ 87	6.3/.../ 6.5	⊗	⊗	+	+
8	82/.../ 83	5.4/.../ 5.6	+	-	+	-
9	76	5.6	+	-	⊗	-
10	64/...../ 71	6.1/...../ 6.9	+	+	+	+
11	66	4.5	⊗	⊗	+	+
12	64	4.5	⊗	⊗	+	+
13	59	4.7	+	-	+	+
14	62	5.6	⊗	⊗	+	-
15	62	5.7	⊗	⊗	+	-

⊗: Keine mehrfach bestätigte Aussage möglich.

Tab. 4.2: Fortsetzung

Nummer	apparentes MW	apparenter pI	Natriumcarbonatbehandlung		Deglykosylierbar durch	
			Niederschlag	Überstand	Neuraminidase	PNGase F
16	63	5.8	+	+	+	-
17	62	5.8	+	+	+	-
18	54	6	+	+	-	+
19	54	6.1	+	+	-	+
20	57	6.3/ 6.4	+	-	+	-
21	51	5.4	+	-	+	-
22	44	4.7/ 4.9	⊗	⊗	+	+
23	44	5.4	⊗	⊗	+	-
24	44	5.5	⊗	⊗	+	-
25	44	5.6	+	-	+	-
26	42	5.2	⊗	⊗	+	-
27	42	5.3	⊗	⊗	+	-
28	42	5.3	⊗	⊗	+	-
29	41/ 42	6.3	⊗	⊗	+	-
30	41/ 42	6.5	⊗	⊗	+	-
31	38/ 39	6.4	⊗	⊗	+	-
32	38	6.2	⊗	⊗	+	+
33	36	6.2	⊗	⊗	+	+
34	36	5.6	+	-	+	-
35	33	5.6	+	-	+	-
36	30	5.1	+	+)*)	+	+
37	26 - 29	4.6/ 4.7	+	-	⊗	+
38	28	5.4	+	-	-	-
39	28	5.7	+	+	-	-
40	26	5.7	+	+	-	-
41	14.7	5.9	+	-	+	-

⊗ : Keine mehrfach bestätigte Aussage möglich.

*) : nur ein schwaches Signal

Bisher konzentrierten sich die Untersuchungen allgemein auf das Proteom lysosomaler Membranproteine. Im Anschluss daran soll nun gezielt auf das Niemann-Pick Typ C-1 (NPC-1) Protein als Vertreter dieses Proteintypus eingegangen werden (Carstea et al., 1997).

4.3 Niemann-Pick Typ C-1 Protein

Wie von Goldstein und Brown (1986) beschrieben wird, findet die hydrolytische Spaltung des LDL Cholesterolesters in der lysosomalen Matrix statt. Die Ausschleusung dieses Cholesterols aus den Lysosomen ins Zytosol erfolgt über das Niemann-Pick Typ C-1 Protein (NPC-1 Protein) (Pentchev et al., 1994).

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, das NPC-1 Protein erstmals in der humanen Plazenta nachzuweisen, seine Verteilung im lysosomalen Kompartiment bezogen auf andere Proteine zu beschreiben und Versuche zur Charakterisierung des Proteins durchzuführen.

4.3.1 Nachweis des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins in schweren Lysosomen

Der Nachweis des NPC-1 Proteins in den schweren Lysosomen der humanen Plazenta mittels Western-Blotting soll mit Hilfe eines von S. Patel zur Verfügung gestellten polyklonalen Kaninchen Antiserums gegen die C-terminale Domäne des humanen Niemann-Pick Typ C-1 Proteins (NPC-1 C) erbracht werden.

Wie aus Abbildung 4.12 ersichtlich, werden nach der Immundetektion mit dem NPC-1 C in Bahn 3 und 4 zwei Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 204 kDa und 173 kDa detektiert, die in der vergleichbaren Probe (Bahn 1) nach der Inkubation mit dem Präimmunserum nicht nachgewiesen werden können.

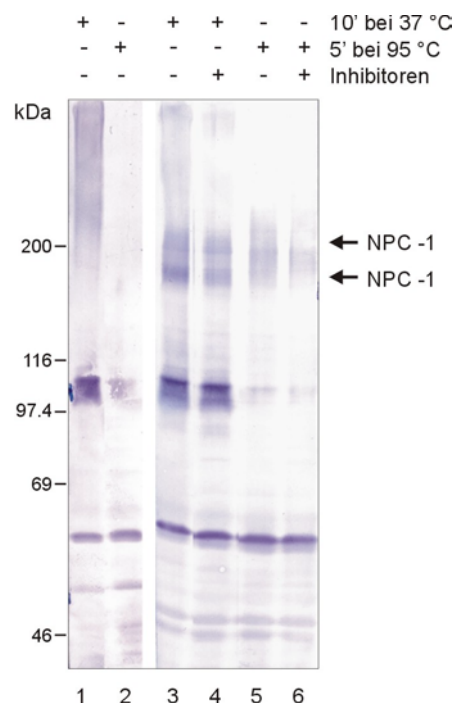


Abb. 4.12: **Nachweis des NPC-1 Proteins und der Temperaturstabilität des Antigens in ultrazentrifugierten lysosomalen Membranen der humanen Plazenta durch Western-Blotting.**

Pro Spur wurden 30 µg ultrazentrifugiertes Membranprotein in reduzierendem Solubilizer aufgenommen. Den Proben 4 und 6 wurden Inhibitoren (IAA, PMSF, ZFF, Leupeptin, Pepstatin A) in der in Kapitel 3.2.3.3 beschriebenen Endkonzentrationen zugesetzt. Die Proben 1, 3 und 4 wurden 10 Minuten bei 37 °C und die Proben 2, 5 und 6 fünf Minuten bei 95 °C inkubiert, anschließend auf einem 8 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Als erster Antikörper wurde für Bahn 1 und 2 das Präimmunserum und in den Bahnen 3 bis 6 das Antiserum NPC-1 C eingesetzt. Als zweiter Antikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper verwendet. Alle Antikörper wurden 1:2000 verdünnt und wurden 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung erfolgt mittels Nitroblautetrazolium/5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl Phosphat (NBT/BCIP).

Durch Erhitzen des NPC-1 Proteins kommt es im Western-Blot zu einem deutlichen Signalverlust. In Bahn 5 und 6 ist sowohl bei 204 kDa als auch bei 173 kDa keine beziehungsweise nur eine schwache Bande zu erkennen.

Der Zusatz von Proteinaseinhibitoren führt zu keinem veränderten Bandenmuster, weder bei 37 °C (Vergleich von Spur 3 und 4) noch bei 95 °C inkubierten Proben (Vergleich von Spur 5 und 6).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe des Antiserums (NPC-1 C) in lysosomalen ultrazentrifugierten Membranen sowohl bei 204 kDa als auch bei 173 kDa eine Bande nachgewiesen werden kann, die im Folgenden dem Niemann-Pick Typ-C 1 Protein zugeordnet werden. Die Solubilisierung des Proteins hängt von der Temperatur ab. Das Niemann-Pick Typ-C 1 Protein darf maximal bei 37 °C inkubiert werden. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen kommt es zu keiner erkennbaren Proteinaseaktivität.

4.3.2 Anreicherung des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins durch die Immunoaffinitätsreinigung lysosomaler Membranproteine

Nachdem gezeigt wurde, dass das NPC-1 Protein in den ultrazentrifugierten Membranen aus dem dichten Pool vorkommt, soll untersucht werden, ob durch die Immunoaffinitätsreinigung lysosomaler Membranen eine Anreicherung des Proteins möglich ist. Es werden ultrazentrifugierte und immunoaffinitätsgereinigte lysosomale Membranproteine eingesetzt. Als Parameter werden einerseits die gleiche Aktivität der sauren β -Glucosidase (2 mU Gesamtaktivität) und andererseits die gleiche Proteinmenge (25 μ g Protein) gewählt.

Die Farbreaktion in Abbildung 4.13 zeigt, dass die Signale des NPC-1 Proteins in Spur 1 und 2 (gleiche saure β -Glucosidaseaktivität) etwa gleich stark sind. In Spur 3 und 4 wird die gleiche Proteinmenge aufgetragen. Hier ist das Signal des NPC-1 Proteins im angereicherten Material (immunoaffinitätsgereinigte Membranen) deutlich stärker als in den gesamten Membranen des dichten Pool (ultrazentrifugierte Membranen).

Die gezeigten Ergebnisse beweisen, dass das NPC-1 Protein durch die Immunoaffinitätsreinigung ähnlich angereichert wird wie die lysosomale saure β -Glucosidase. Zwischen beiden Parametern besteht eine positive Korrelation.

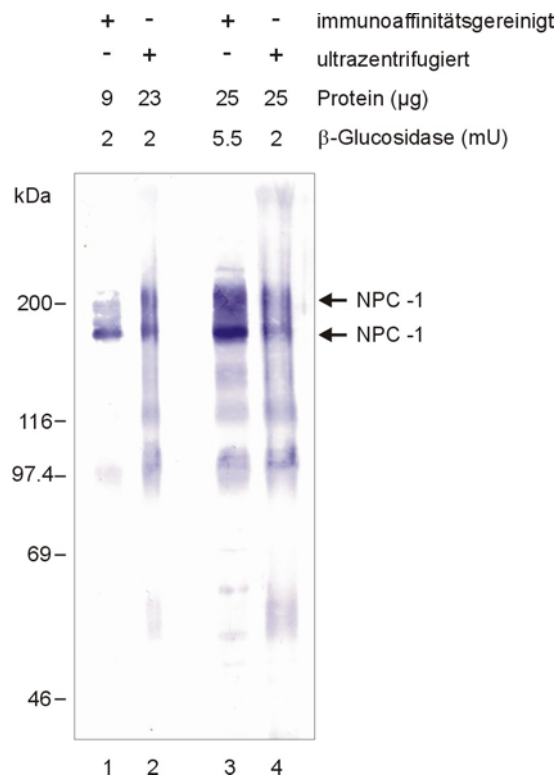


Abb. 4.13: **Nachweis des NPC-1 Proteins im Western-Blot bei immunoaffinitätsgereinigten und ultrazentrifugierten lysosomalen Membranen.**

Die solubilisierten und reduzierten Proben wurden 10 Minuten bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf einem 8 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membran geblottet wurden. Bei der Immundetektion dient als erster Antikörper das NPC-1 C Antiserum und als zweiter ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Ziege-gegen-Kaninchen Antikörper. Beide wurden 1:2000 verdünnt eingesetzt und jeweils 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung erfolgte mittels NBT/BCIP.

Im weiteren Verlauf der Untersuchung soll geklärt werden, ob die Verteilung des NPC-1 Proteins im Percoll®-Gradienten mit der bekannter lysosomaler Proteine vergleichbar ist.

4.3.3 Untersuchung lysosomaler Parameter im Verlauf eines Percoll®-Gradienten

Die Aktivität des lysosomalen Markerproteins, der β-Hexosaminidase, wird im Verlauf des verwendeten Percoll®-Gradienten bereits von Diettrich et al. (1996) beschrieben. Es sollen weitere Parameter zur Charakterisierung eines repräsentativen Gradienten herangezogen werden und anschließend die Verteilung lysosomaler Proteine, sowohl löslicher (β-Hexosaminidase und Kathepsin D) (Gieselmann et al., 1983) als auch membrangebundener (saure β-Glucosidase, LAMP-2, N-Acetyltransferase und NPC-1 Protein), analysiert werden. Ergänzend soll die Aktivität der alkalischen Phosphatase, eines Markerenzym der Plasmamembran, bestimmt werden.

4.3.3.1 Protein- und Enzymbestimmung der Fraktionen des Percoll®-Gradienten

Die Verteilung der sauren β -Glucosidase, der β -Hexosaminidase, der *N*-Acetyltransferase und der alkalischen Phosphatase soll Aufschluss über deren Vorkommen in den Fraktionen unterschiedlicher Dichte geben. Ein besonderes Augenmerk richtet sich auf die schweren Lysosomen in den Fraktionen größerer Dichte und die so genannten leichten Lysosomen in Fraktionen geringerer Dichte.

Von jeder Fraktion des Percoll®-Gradienten wird die Bestimmung der jeweiligen Enzymaktivität und der Proteinkonzentration durchgeführt.

Es zeigt sich sowohl bei der sauren β -Glucosidase, der β -Hexosaminidase, als auch bei *N*-Acetyltransferase eine zweigipfelige Verteilung (siehe Abbildung 4.14 und 4.15). Der erste Peak, Fraktion 1 bis 6, wird aufgrund der höheren Dichte im Percoll®-Gradient formal als so genannter schwerer Peak beziehungsweise die Lysosomen als schwere Lysosomen bezeichnet. Umgekehrt werden die Fraktionen 7 bis 12 der vergleichbar geringeren Dichte als so genannter leichter Peak beschrieben und die Lysosomen als leichte Lysosomen bezeichnet. Die restlichen Fraktionen (13 bis 16) liegen außerhalb des Percoll®-Gradienten zur Isolierung von Lysosomen (Rome et al., 1979). Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist hauptsächlich in den Fraktionen 11 bis 14 des Percoll®-Gradienten zu messen.

Beim gezeigten Percoll®-Gradienten befinden sich 21 % der sauren β -Glucosidase im dichten Pool und 51 % im weniger dichten Pool, den jeweiligen vereinigten Fraktionen des entsprechenden Peaks. Bei der *N*-Acetyltransferase ist 25.6 % der Enzymaktivität im schweren und 62.5 % im weniger dichten Pool zu messen. Die Verteilung der β -Hexosaminidase gestaltet sich folgendermaßen: 38 % befinden sich im schweren und 47 % im weniger dichten Pool. Die alkalische Phosphatase kommt im Durchschnitt zu 0.42 % im schweren und zu 43.76 % im weniger dichten Pool vor. Im Vergleich dazu sind 4 % des Proteins in den Fraktionen 1 bis 6 und 49 % in den Fraktionen 7 bis 12. In Tabelle 4.4 ist die Verteilung der Enzyme und des Proteins nochmals dargestellt. Es handelt sich um Mittelwerte aus mehreren Plazentenpräparationen.

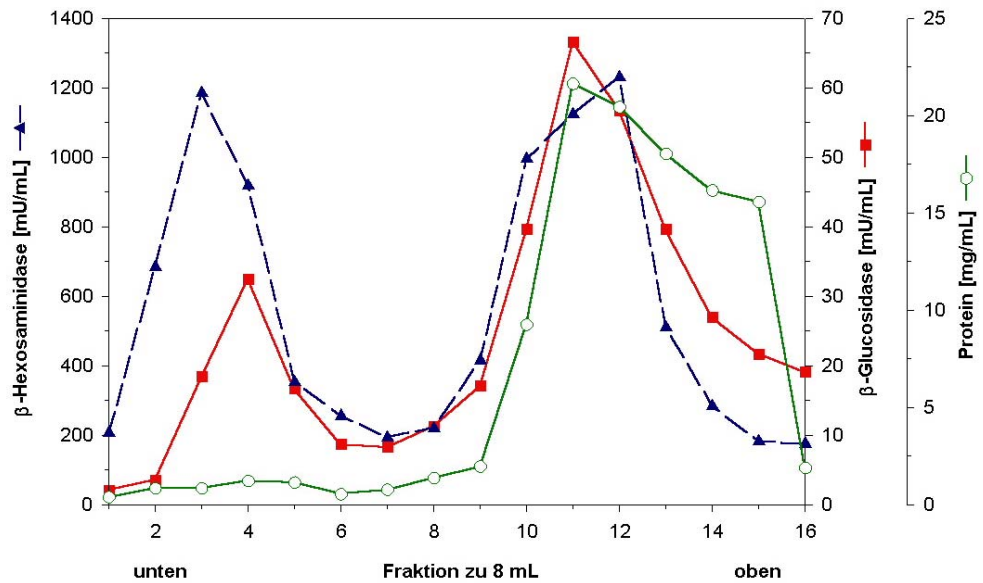


Abb. 4.14: Verteilung der sauren β -Glucosidase, der β -Hexosaminidase und des Proteins eines repräsentativen Percoll®-Gradienten.

Für die Aktivitätsbestimmung der sauren β -Glucosidase wurde die Probe zehnfach und für die der β -Hexosaminidase in der Regel 200-fach verdünnt eingesetzt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Fraktionen 1 bis 7 zehnfach und die restlichen Fraktionen zwanzigfach verdünnt.

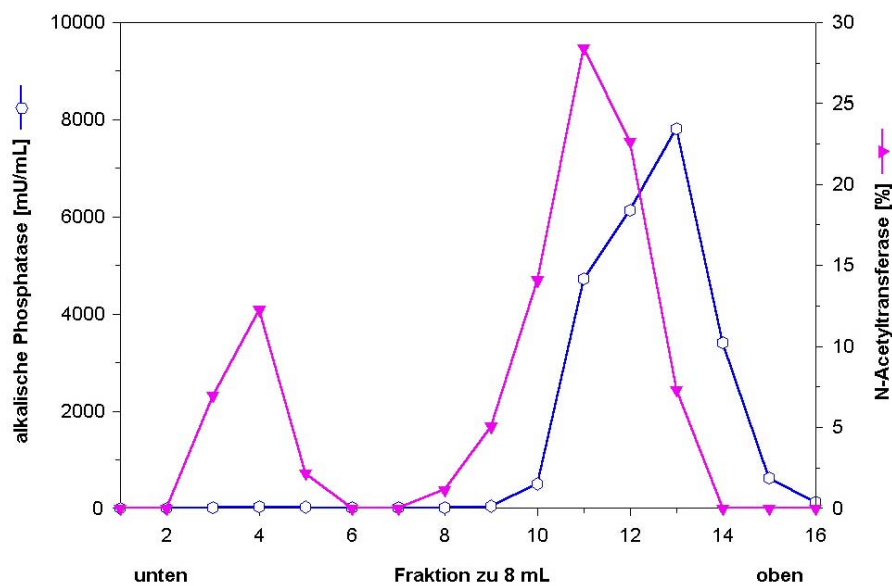


Abb. 4.15: Verteilung der *N*-Acetyltransferase und der alkalischen Phosphatase eines repräsentativen Percoll®-Gradienten.

Für die Aktivitätsbestimmung der *N*-Acetyltransferase wurden die Proben unverdünnt und für die alkalische Phosphatase in den Fraktionen 1 bis 8 unverdünnt, in den Fraktionen 9 bis 16 zehnfach bis hundertfach verdünnt eingesetzt.

Tab. 4.3: **Prozentuale Verteilung der alkalischen Phosphatase, der *N*-Acetyltransferase, der sauren β -Glucosidase, der β -Hexosaminidase und des Proteins in schweren und leichten Fraktionen des Percoll®-Gradienten.**

	Schwerere Fraktionen (Fraktion 1 bis 6)	Leichte Fraktionen (Fraktion 7 bis 12)
alkalische Phosphatase [%]¹	0.42	43.76
Abweichung [%]	+/- 0.01	+/- 8.9
<i>N</i>-Acetyltransferase [%]¹	25.6	62.5
Abweichung [%]	+/- 4.2	+/- 8.8
saure β-Glucosidase [%]²	20	57
Abweichung [%]	+/- 3	+/- 11
β-Hexosaminidase [%]²	35	49
Abweichung [%]	+/- 6	+/- 7
Protein [%]³	4	46
Abweichung [%]	+/- 1	+/- 12

¹ Mittelwerte aus 2 Plazenten

² Mittelwerte aus 9 Plazenten

³ Mittelwerte aus 7 Plazenten

Zur Isolierung der lysosomalen Membranproteine (unabhängig davon, ob sie aus den schweren oder den leichten Fraktionen gewonnen werden) sollen nicht alle Fraktionen gemischt werden, um die Kontamination durch Proteine, die nicht den schweren oder leichten lysosomalen Proteinen zugeordnet werden, zu minimieren. Die schweren lysosomalen Membranen werden, wie von Dietrich et al. (1996) beschrieben, aus dem dichten Pool (Fraktion 2 bis 5) isoliert. Auf Fraktion 6 wird verzichtet, da diese eine Mischung aus schweren und leichten Lysosomen darstellt. Die leichten Membranen werden aus Fraktion 7 bis 9 gewonnen, da es in den Fraktionen 10 bis 12 zu einem deutlichen Anstieg der Proteinkonzentration kommt und so die Gefahr des „Mitschleppens“ nicht lysosomaler Proteine überproportional steigt. Als Beispiel hierfür dient der in Abbildung 4.15 gezeigte Verlauf der alkalischen Phosphatase, einem Markerprotein der Plasmamembran. Ab Fraktion 10 ist ein deutlicher Anstieg der Aktivität dieses Enzyms erkennbar.

4.3.3.2 Das Niemann-Pick Typ C-1 Protein, LAMP-2 und Kathepsin D im Verlauf des Percoll®-Gradienten

In einem weiteren Schritt soll das Vorkommen des NPC-1 Proteins im Verhältnis zum LAMP-2 analysiert werden und der Nachweis des Kathepsin D (EC 3.4.23.5), einer sauren, lysosomalen Aspartyl-Proteinase (zur Übersicht: Barrett 1977 und 1979), erbracht werden.

Beim Vergleich der Western-Blots in Abbildung 4.16 und 4.17 fällt die jeweils zweigipfelige Verteilung des LAMP-2, des reifen Kathepsin D (reifes CD) und des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins auf. Alleine das Prokathepsin D (pCD) ist ausschließlich im zweiten Peak, den leichten Fraktionen, zu detektieren. Übereinstimmend ist im schweren Peak in Fraktion 4 das stärkste Signal aller untersuchten Proteine zu sehen. Das NPC-1 Protein und Kathepsin D weisen im leichten Peak in Fraktion 10 das stärkste Signal auf, wohingegen es beim LAMP-2 in Fraktion 12 kommt.

Die Beobachtung, dass das Prokathepsin D nur in den Fraktionen 8 bis 13 zu detektieren ist führt zu der Vermutung, dass es sich hierbei um das lysosomal-endosomale Kompartiment handelt, dem Ort der Reifung des Kathepsin D (Gieselmann, 1983).

Die Zusammenfassung der gezeigten Ergebnisse führt bezüglich des NPC-1 Proteins zu folgenden Schlüssen: Es kommt sowohl im schweren (dichten) lysosomalen als auch im leichten lysosomalen Kompartiment vor. Seine Verteilung verläuft in den schweren Lysosomen ähnlich der des LAMP-2, der sauren β -Glucosidase und der *N*-Acetyltransferase. In den leichten Fraktionen verläuft die Verteilung des NPC-1 Proteins parallel mit der Verteilung der beschriebenen Proteine. Diese zeigen aber eine Verschiebung in den leichten Bereich. Bei der sauren β -Glucosidase und der *N*-Acetyltransferase beträgt diese Verschiebung eine Fraktion und bei LAMP-2 zwei Fraktionen.

Der Nachweis sowohl des Prokathepsin D, des Kathepsin D als auch der β -Hexosaminidase dienen hier ausschließlich der Charakterisierung des Percoll®-Gradienten hinsichtlich der Verteilung lysosomaler Parameter und werden bei der Untersuchung lysosomaler Membranproteine nicht zur weiteren Charakterisierung der Proben herangezogen.

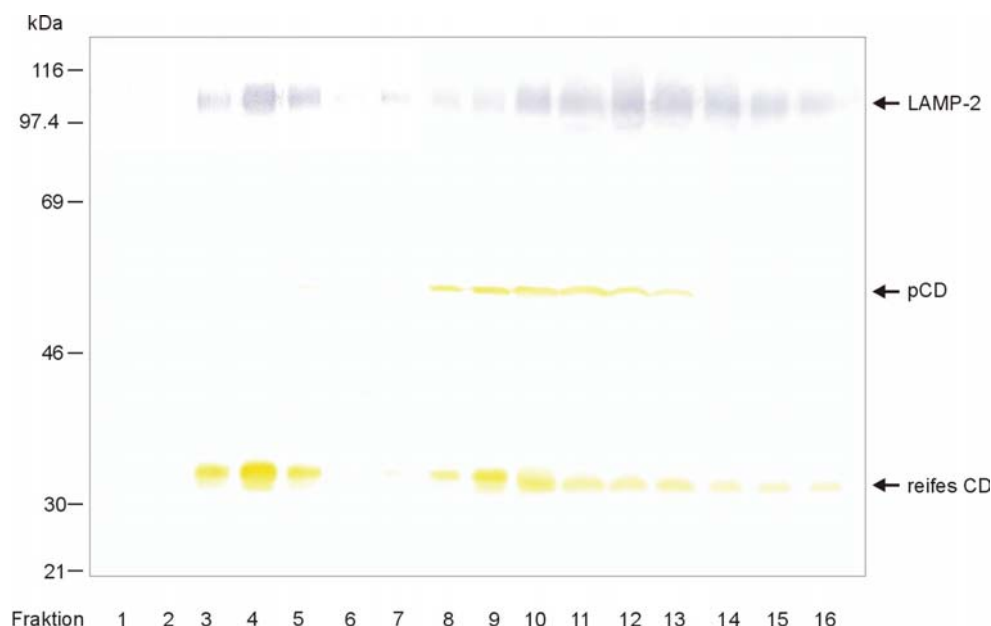


Abb. 4.16: **Western-Blot von LAMP-2 und Kathepsin D im Verlauf des Percoll®-Gradienten.**

Für den Nachweis des LAMP-2 und des Kathepsin D wurden 5 μ L pro Fraktion (1-16) in reduzierendem Solubilizer aufgenommen, 5 Minuten bei 95 °C erhitzt, zentrifugiert, über ein 14.1 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und abschließend auf eine PVDF-Membran geblottet.

Zuerst wurde die Immundetektion des LAMP-2 durchgeführt. Der 2D5 (monoklonaler Antikörper gegen das humane LAMP-2) wurde ebenso wie der zweite Antikörper, ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Ziege-gegen-Maus Antikörper, mit einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Beide wurden 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an die Färbung mit NBT/BCIP wird die PVDF-Membran nochmals blockiert. Hieran schloss sich die zweite Immundetektion, die des Kathepsin D, an. Die beiden Antikörper α -CD und ein Meerrettichperoxidase-gekoppelter Ziege-gegen-Kaninchen Antikörper inkubieren nacheinander jeweils 2 Stunden bei Raumtemperatur (Verdünnung je 1:4000), bevor die Färbung mit Diaminobenzidin/ Wasserstoffperoxid (DAB/ H_2O_2) durchgeführt wird.

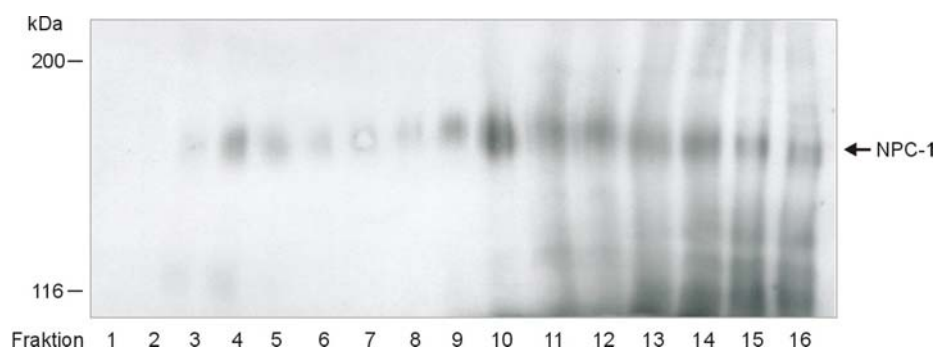


Abb. 4.17: **Western-Blot des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins im Verlauf des Percoll®-Gradienten.**

Für den Nachweis des NPC-1 Proteins wurden jeweils 12.5 μ L pro Fraktion (1-16) in reduzierendem Solubilizer aufgenommen, 10 Minuten bei 37 °C inkubiert zentrifugiert, über ein 5.1 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgels elektrophoretisch getrennt und anschließend auf PVDF-Membran geblottet.

Das NPC-1 C Antiserum und der Meerrettichperoxidase-gekoppelte Ziege-gegen-Kaninchen Antikörper wurden 1:6000 verdünnt und nacheinander jeweils 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Visualisierung mittels enhanced Chemoluminescence (ECL).

4.3.4 Immunoaffinitätsreinigung des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins im Verlauf des Percoll®-Gradienten

In Kapitel 4.3.2 wird beschrieben, dass es möglich ist, das NPC-1 Protein aus schweren Lysosomen über Immunoaffinitätsreinigung anzureichern. Weiterhin wird anhand des Percoll®-Gradienten (Abbildung 4.17) gezeigt, dass das NPC-1 Protein in den leichten lysosomalen Fraktionen stärker vertreten ist als in den schweren lysosomalen Fraktionen. Nun soll geprüft werden, ob die Immunoaffinitätsreinigung auch mit den Membranen der leichten Lysosomen beziehungsweise des besseren Vergleichs wegen, mit allen Fraktionen des Gradienten durchgeführt werden kann, um ein weiteres Bild hinsichtlich der Verteilung zu bekommen.

Es zeigt sich in Abbildung 4.18 eine zweigipfelige Verteilung des NPC-1 Proteins und eine ebensolche für LAMP-2. Im schweren Peak (Fraktion 1 bis 6) ist das deutlichste Signal beider Proteine in Fraktion 4 zu sehen. Im zweiten, im leichten Bereich (Fraktion 7 bis 12) ist das stärkste Signal des NPC-1 Proteins in den Fraktionen 9 und 10 und für LAMP-2 in Fraktion 11 und 12 detektierbar. Bei der Betrachtung des Auftretens des NPC-1 Proteins in den einzelnen Fraktionen (1 bis 10) verglichen mit dem des LAMP-2 zeigt sich, dass das stärkste Signal des NPC-1 Proteins in Fraktion 9 und das des LAMP-2 in Fraktion 4 zu sehen ist.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich Vorkommen und Verteilung des NPC-1 Proteins sowohl bei den schweren als auch den leichten lysosomalen Membranen nach der Immunoaffinitätsreinigung, verglichen mit den ungereinigten Fraktionen des Percoll®-Gradienten, bestätigen lassen. Es besteht keine Proportionalität zwischen dem NPC-1 Protein und LAMP-2.

Nachdem in den leichten lysosomalen Membranen ein verstärktes Signal des NPC-1 Proteins detektiert wird, soll durch den folgenden Versuch geklärt werden, ob es möglich ist, das Protein mit Hilfe eines direkt an den Percoll®-Gradienten anschließenden Saccharose-Gradienten weiter aufzureinigen.

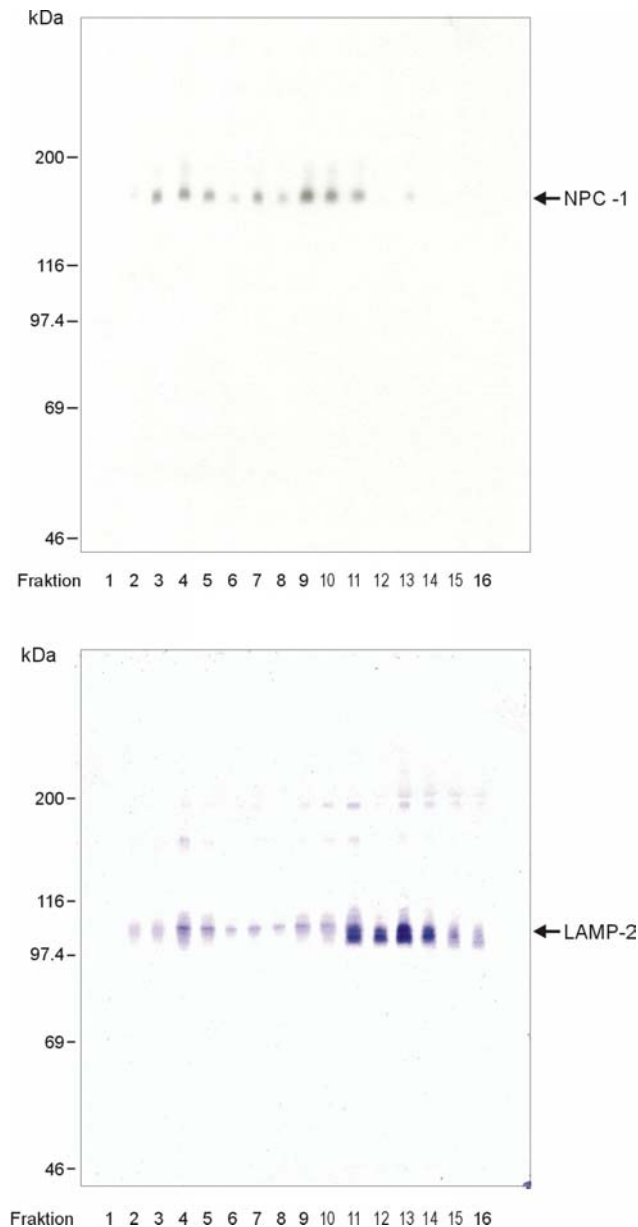


Abb. 4.18: **Western-Blots des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins (oben) und des LAMP-2 (unten) im Verlauf des Percoll®-Gradienten nach Immunoaffinitätsreinigung.**

Jede Fraktion des Percoll®-Gradienten wurde mit Hilfe des an Eupergit-C1Z gekoppelten 2D5 einer Immunoaffinitätsreinigung unterzogen. Pro Spur wurde das 40 µL Ausgangsmaterial entsprechende immunoaffinitätsgereinigte Membranprotein aufgetragen. Die Proben wurden in reduzierendem Solubilizer aufgenommen und nach der zehnminütigen Inkubation bei 37 °C ebenso lange bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\max}$) zentrifugiert. Die Proben wurden auf ein 8 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel mit 33 Taschen aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran gebロットet und geblockt.

Im Western-Blot sollen das NPC-1 Protein und LAMP-2 nachgewiesen werden. Für die Immundetektion des ersten Proteins wurden sowohl der erste Antikörper, das NPC-1 C Antiserum als auch der zweite Antikörper, ein mit Meerrettichperoxidase konjugierter Ziege-gegen-Kaninchen Antikörper, 1:6000 verdünnt und nacheinander jeweils 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Visualisierung mittels enhanced Chemoluminescence (ECL) durchgeführt wurde. Im Anschluss an diese Detektion wurde die Membran nochmals blockiert, bevor eine zweistündige Inkubation des 1:4000 verdünnten 2D5 (gegen LAMP-2 gerichtet) und eine ebenso lange Inkubation des 1:4000 verdünnten mit alkalischer Phosphatase konjugierter Ziege-gegen-Maus Antikörper bei Raumtemperatur folgte. Die Färbung erfolgte mit Hilfe des NBT/BCIP.

4.3.5 Aufreinigung des NPC-1 Proteins mit Hilfe eines Saccharose-Gradienten

Ziel ist es, eine Möglichkeit zur weiteren Aufreinigung des NPC-1 Proteins in nativem Zustand zu finden. Hierfür soll ein linearer Saccharose-Gradienten direkt im Anschluss an den Percoll®-Gradienten durchgeführt werden. Er dient der Differenzierung leichter Lysosomen und daraus folgend der Trennung des NPC-1 Proteins von unerwünschten Organellen ähnlicher Dichte. Die Grundvoraussetzung für diese Methode ist das Intaktsein der zu trennenden Organellen und speziell der leichten Lysosomen. Nur hiermit kann die Auftrennung über den Dichtegradienten erfolgreich durchgeführt werden.

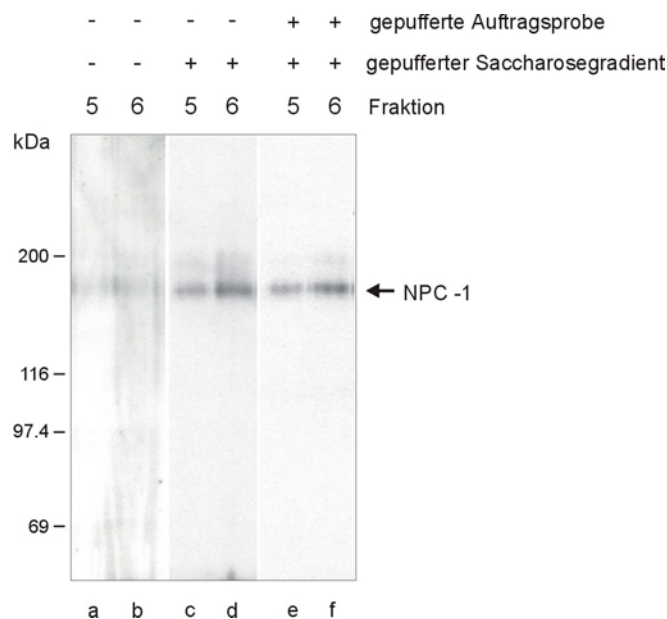


Abb. 4.19: **Western-Blot des NPC-1 Proteins (ELC-Nachweis).** Dargestellt sind die gleichen Fraktionen (5 und 6) von Saccharose-Gradienten (18 bis 50 % [w/w] Saccharose) unterschiedlicher Pufferbedingungen: a) ungepufferte Saccharoselösung (pH 5.5) und Auftragsprobe (Bahn a und b) gepufferte Saccharoselösung und ungepufferte Auftragsprobe (Bahn c und d) sowohl die Saccharoselösungen als auch die Auftragsprobe sind gepuffert (Bahn e und f). Die Pufferung erfolgte jeweils mit 20 mM Natriumphosphat pH 6.8.

Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurde in einem 12 mL fassenden Röhrchen ein linearer Saccharose-Gradient mit 18 bis 47 % [w/w] Saccharose beziehungsweise 30 bis 47 % [w/w] Saccharose hergestellt. Die Saccharoselösungen waren entweder ungepuffert oder enthielten 20 mM Natriumphosphat pH 6.8. Je 1 mL der Fraktionen 8 und 9 des Percoll®-Gradienten wurden vereinigt, auf 50 % [w/w] Saccharose gebracht und mit den entsprechenden Mengen Proteinaseinhibitoren versetzt. Von dieser Lösung wurden 1.5 mL unter den Gradienten geschichtet. Im Anschluss an die Zentrifugation und die abschließende Fraktionierung wurde eine enzymatische Bestimmung der sauren β -Glucosidase durchgeführt. Für die Bestimmung des NPC-1 Protein und LAMP-2 wurden 15 μ L der einzelnen Fraktionen des Gradienten (18 bis 50 % [w/w] Saccharose) mit reduzierendem Solubilizer gemischt, 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und 20 Minuten bei 18 000 Umdrehungen pro Minute ($36\,410 \times g_{\max}$) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein 8 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, aufgetrennt und abschließend auf PVDF-Membran geblottet und blockiert. Für die Immundetektion des NPC-1 Proteins wurden sowohl der erste Antikörper, das NPC-1 C Antiserum, als auch der zweite Antikörper, ein mit Meerrettichperoxidase konjugierter Ziege-gegen-Kaninchen Antikörper, 1:6000 verdünnt. Der nacheinander durchgeführten zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur folgte die Visualisierung mittels enhanced Chemoluminescence (ECL).

In einem Vorversuch werden deutliche Verluste des NPC-1 Proteins beobachtet. Daraus folgend wird untersucht, ob eine Pufferung der – für den Gradienten bestimmten – Saccharoselösungen zu einer Verbesserung der Ausbeute führt.

Bei der Auswertung der in Abbildung 4.19 dargestellten Ergebnisse ist zu erkennen, dass es ohne Pufferung des Saccharose-Gradienten (Bahn a und b) zu einem weitgehenden Abbau des NPC-1 Proteins kommt. Durch die Pufferung der Saccharoselösungen kommt es, unter den gegebenen Versuchsbedingungen, zu einer Minimierung des Abbaus des NPC-1 Proteins (Bahn c und d). Eine zusätzliche Pufferung der Auftragsprobe führt zu keiner weiteren Ausbeuteerhöhung (Bahn e und f).

In Abbildung 4.20 ist der Verlauf der sauren β -Glucosidase nach Auftrennung leichter lysosomaler Membranen der Fraktionen 8 und 9 eines Percoll®-Gradienten unter den Bedingungen eines optimierten, also gepufferten, Saccharose-Gradienten dargestellt. Die höchste Enzymaktivität ist in Fraktion 6 zu messen. Diese Fraktion entspricht einer theoretischen Saccharosekonzentration von 39 % [w/w] und einer theoretischen Dichte von 1.1783 [g/cm³] (Holtzhauer, 1995).

Abbildung 4.21 zeigt die Verteilung des NPC-1 Proteins und des LAMP-2 in den Fraktionen 3 bis 10 des optimierten Gradienten mit einer Saccharosekonzentration von 30 bis 50 % [w/w] Saccharose. Auf die Darstellung der Fraktionen 1, 2, 11 und 12 wird verzichtet, da hier keines der zu untersuchenden Proteine detektierbar ist.

Sowohl das NPC-1 Protein als auch LAMP-2 sind hauptsächlich in den Fraktionen 5 bis 7 zu detektieren. Das entspricht einer theoretischen Saccharosekonzentration von 37 bis 41 % [w/w] Saccharose und einer theoretischen Dichte von 1.168 bis 1.1816 [g/cm³] (Holtzhauer, 1995).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Auftrennung so genannter leichter Fraktionen eines Percoll®-Gradienten über einen optimierten Saccharose-Gradienten eine Möglichkeit zur nativen Aufreinigung des NPC-1 Proteins darstellt. In den Fraktionen des Saccharose-Gradienten besteht zwischen der Aktivität der sauren β -Glucosidase und dem über Western-Blotting nachgewiesenen NPC-1 Protein eine positive Korrelation. Diese Beziehung wurde auch in den schweren Fraktionen des Percoll®-Gradienten beobachtet (Kapitel 4.3.3.1 und 4.3.3.2). Daher kann die Aktivität der sauren β -Glucosidase in unbekannten Proben als Hinweis für das NPC-1 Protein dienen.

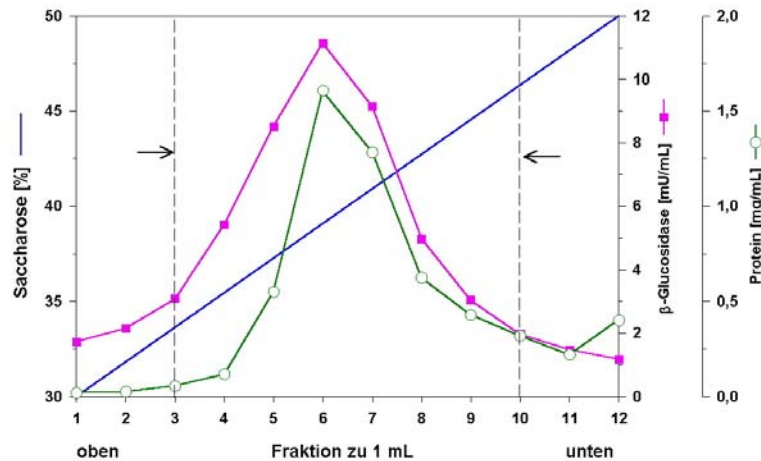


Abb. 4.20: **Verlauf der sauren β -Glucosidase und des Proteins eines Gradienten mit 30 bis 50 % [w/w] Saccharose in 20 mM Natriumphosphat pH 6.8.** Es werden so genannte leichte Fraktionen (8 und 9) eines Percoll®-Gradienten aufgetrennt. Die Diagonale beschreibt den Verlauf des Saccharose-Gradienten. Der mit Pfeilen markierte, grau unterlegte Bereich grenzt die in Abbildung 4.21 gezeigten Fraktionen ein.

Für die Bestimmung der sauren β -Glucosidase wurden die Proben unverdünnt eingesetzt. Für die Proteinbestimmung wurden die Proben, je nach Proteinkonzentration, unverdünnt bis zehnfach verdünnt eingesetzt.

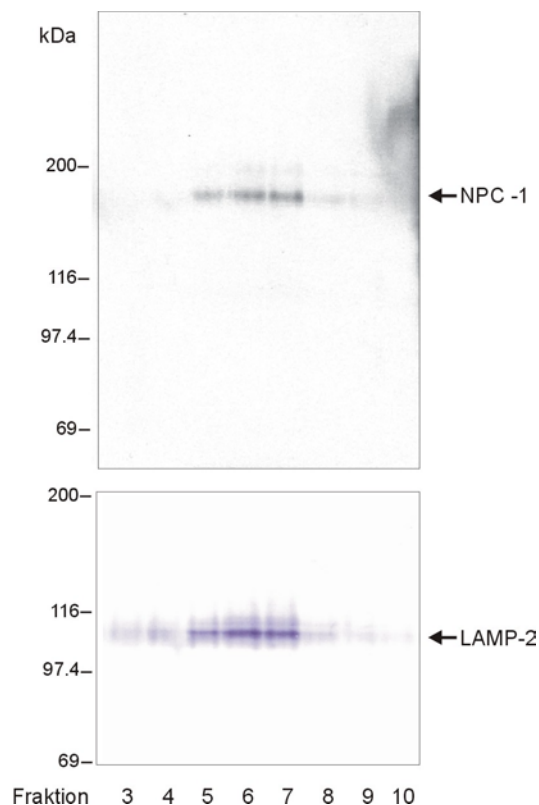


Abb. 4.21: **Western-Blot des NPC-1 Proteins (ECL) und des LAMP-2 (NBT/BCIP).** Dargestellt sind die Fraktionen 3 bis 10 eines mit Natriumphosphat gepufferten Saccharose-Gradienten (30 bis 50 % [w/w] Saccharose) und einer ebenso gepufferten Auftragsprobe.

Es wurden 15 µL der einzelnen Fraktionen des Gradienten (30 bis 50 % [w/w] Saccharose) mit reduzierendem Solubilizer gemischt, 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und 20 Minuten bei 18 000 Umdrehungen pro Minute ($36\,410 \cdot g_{\max}$) zentrifugiert. Das solubilisierter Protein wurde auf ein 8 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, aufgetrennt und abschließend auf PVDF-Membran geblottet und blockiert. Für die Immundetektion des NPC-1 Proteins wurden sowohl der erste Antikörper, das NPC-1 C Antiserum, als auch der zweite Antikörper, ein mit Meerrettichperoxidase konjugierter Ziege-gegen-Kaninchen Antikörper, 1:6000 verdünnt. Der nacheinander durchgeführten zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte die Visualisierung mittels enhanced Chemoluminescence (ECL). Vor der Immundetektion des LAMP-2 wurde die Membran nochmals blockiert. Es folgte eine zweistündige Inkubation des 1:4000 verdünnten anti-LAMP-2 Antikörpers 2D5 und eine ebenso lange Inkubation des 1:4000 verdünnten, mit alkalischer Phosphatase konjugierten Ziege-gegen-Maus Antikörpers, jeweils bei Raumtemperatur. Die Färbung erfolgte mit Hilfe des NBT/BCIP.

Des Weiteren besteht eine im Saccharose-Gradienten zu beobachtende positive Korrelation des über Western-Blotting nachgewiesenen LAMP-2 mit den beiden im oberen Abschnitt beschriebenen lysosomalen Parametern, der sauren β -Glucosidase und des NPC-1 Proteins. Es wird davon ausgegangen, dass die untersuchten leichten Fraktionen einem Kompartiment zuzuordnen sind.

Nachdem das Vorkommen des NPC-1 Proteins in beiden Dichtebereichen des Percoll[®]-Gradienten betrachtet wurde, schließen sich im Folgenden Untersuchungen zur Charakterisierung des Proteins hinsichtlich seiner Glykosylierung an.

4.3.6 Deglykosylierung des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins

Wie Carstea et al. 1997 beschrieben haben, besitzt das NPC-1 Protein 14 potentielle N-Glykosylierungsstellen. Im Folgenden soll versucht werden, sämtliche Typen Asparagin-gebundener N-Glykane vom Proteinrückgrat des Proteins mit Hilfe der Peptid-N⁴-N-(Acetyl- β -Glucosaminy) Asparagin Amidase (Peptid N-Glycosidase F) zu spalten.

Durch vierstündige Inkubation immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine mit Peptid N-Glycosidase F kommt es zur Deglykosylierung des NPC-1 Proteins (siehe Abbildung 4.22). Wie durch den Vergleich der beiden Spuren in Abbildung 4.22 erkennbar ist, sind weder das NPC-1 Signal bei 204 kDa noch bei 173 kDa im Anschluss an die Abspaltung Asparagin-gebundener N-Glykane detektierbar. Statt dessen erscheint eine neue Bande bei 151 kDa.

Die beiden Formen des in der Plazenta vorkommenden NPC-1 Proteins (204 und 173 kDa) unterscheiden sich demnach in der Zahl oder der Größe der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidseitenkette.

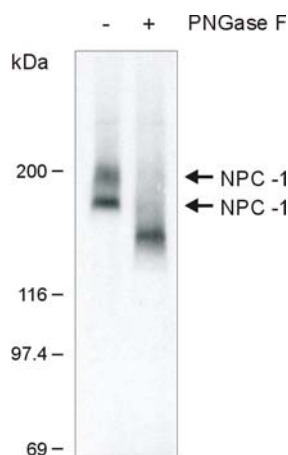


Abb. 4.22: **Western-Blot des NPC-1 Proteins nach Deglykosylierung mit Peptid N-Glycosidase F.** Je Spur werden 35 µg Protein eingesetzt. Das entspricht einer sauren β -Glucosidaseaktivität von 2.2 mU.

Zur Deglykosylierung des NPC-1 Proteins wurden immunoaffinitätsgereinigte Membranen der Fraktionen 8 und 9 des Percoll®-Gradienten eingesetzt. 70 µg des über 2D5-Eupergit C1Z-Perlen gereinigten Membranproteins wurden mit dem gleichen Volumen Peptid N-Glycosidase F-Puffer gemischt, 10 Minuten bei 37 °C inkubiert, mit einem Probenvolumen Wasser versetzt und 5 Minuten bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \times g_{\max}$) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 2 Reaktionsgefäße aufgeteilt. Einem Überstand wurden 0.02 Einheiten Peptid N-Glycosidase F zugesetzt. Beide Ansätze, sowohl der ohne als auch der mit Enzym, wurden anschließend 4 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die Proben wurden in reduzierendem Solubilizer aufgenommen und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an eine fünfminütige Zentrifugation bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \times g_{\max}$) wurde der Überstand auf ein 8 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, getrennt und abschließend auf PVDF-Membran geblottet.

Für die Immundetektion des NPC-1 Proteins wurden sowohl der erste Antikörper, das NPC-1 C Antiserum, als auch der zweite Antikörper, ein mit Meerrettichperoxidase konjugierter Ziege-gegen-Kaninchen Antikörper, 1:6000 verdünnt. Der nacheinander durchgeführten zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte die Visualisierung mittels enhanced Chemoluminescence (ECL).

Abschließend kann behauptet werden, dass es sich beim aus dem Gewebe der humanen Plazenta isolierten NPC-1 Protein um ein N-glykosyliertes Membranprotein handelt, dessen Behandlung mit der Peptid N-Glycosidase F zu einer Reduktion des Molekulargewichts um 53 beziehungsweise 22 kDa führt. Das scheinbare Molekulargewicht des deglykosylierten Proteins liegt mit seinen 151 kDa um 9 kDa höher als das theoretisch aus der Aminosäuresequenz errechnete (Carstea et al., 1997).

4.4 Weiterführende Charakterisierung und Vergleiche der schweren und leichten Fraktionen des Percoll®-Gradienten

Pertoft et al. (1978) haben die Heterogenität der Lysosomen in Abhängigkeit vom Alter und ihrer Dichte beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnten verschiedene lysosomale Proteine, das NPC-1 Protein, LAMP 2, die N-Acetyltransferase, die saure β -Glucosidase, die β -Hexosaminidase und das Kathepsin D nicht nur in den Fraktionen höherer Dichte sondern auch in Fraktionen niedrigerer Dichte des Percoll®-Gradienten nachgewiesen werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollen vereinigte schwere (dichter Pool; im Englischen: dense pool) und leichte Fraktionen (weniger dichter Pool; im Englischen: light-bouyancy-pool) im Hinblick auf ihre Lipidzusammensetzung und ihr Proteinmuster verglichen werden.

Die eingesetzten Fraktionen des Percoll®-Gradienten werden, bezogen auf die in Kapitel 4.3.3 gezeigten Ergebnisse, so gewählt, dass, vor allem bei den leichten Fraktionen, die Kontamination durch Mitochondrien (Dietrich et al., 1996) und die Plasmamembran minimiert wird.

4.4.1 Lipidzusammensetzung der lysosomalen Membran

Die Zusammensetzung der lysosomalen Membranlipide wurde schon 1974 von Henning und Heidrich beschrieben. Für ihre Untersuchung verwandten sie aus Rattenleber über Free-Flow-Elektrophorese gewonnene Lysosomen.

Im Folgenden wird die Lipidzusammensetzung (siehe Tabelle 4.3) der aus humaner Plazenta gewonnenen Lysosomen untersucht. Die massenspektrometrische Analyse des Pools der schweren und leichten Fraktionen wurde 2000 von der Arbeitsgruppe Elina Ikonen des National Public Health Institute in Helsinki, Finnland durchgeführt.

Der Vergleich der prozentualen Verteilung der Phosphoglyceride (Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol) untereinander in den Proben der schweren und leichten Fraktionen zeigt, dass das Phosphatidylcholin in allen Proben das prozentual am stärksten vertretene Lipid ist, gefolgt vom Phosphatidylethanolamin, dem Phosphatidylinositol und dem Phosphatidylserin. Letzteres konnte auf Grund der unteren Nachweisgrenze nicht in allen Proben bestimmt werden.

Bezogen auf die gesamte Lipidmenge ist der Anteil des Phosphatidylcholins in den Proben der leichten Fraktionen (44.9 %, 47.0 % beziehungsweise 42.4 %) um etwa 10 % höher als bei den vergleichbaren Proben der schweren Fraktionen (35.2 %, 29.2 % beziehungsweise 32.8 %). Die Proben der leichten Fraktionen enthalten im Schnitt 24 % Phosphatidylethanolamin und die der schweren Fraktionen 20 % bezogen auf das Gesamtlipid.

Tab. 4.4: Prozentuale Verteilung der Lipide in nmol lysosomaler Präparationen, Ausgangsmaterial, ultrazentrifugierte und immunoaffinitätsgereinigte Membranen der schweren und der leichten Fraktionen (dichter Pool und weniger dichter Pool).

	Sphingomyelin	Cholesterol	Phosphatidylcholin	Phosphatidylethanolamin	Phosphatidylserin	Phosphatidylinositol
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
dichter Pool (DP)	8.2	30.5	35.2	17.9	- ¹⁾	8.1
Ultrazentrifugierte DP-Membranen	7.1	32.7	29.2	21.4	2.9	6.7
Affinitätsgereinigte DP-Membranen	15.4	25	32.8	20	4.3	2.6
weniger dichter Pool (WDP)	5.4	20.7	44.9	23.2	- ¹⁾	5.8
Ultrazentrifugierte WDP-Membranen	5.8	14.6	47	26.8	- ¹⁾	5.8
Affinitätsgereinigte WDP-Membranen	6.6	20.1	42.4	22.3	2	6.6

1) Lipidmenge liegt außerhalb des messbaren Bereichs.

In Abbildung 4.23 ist die prozentuale Verteilung des Cholesterols, des Sphingomyelins und der Summe der Phosphoglyceride (Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylethanolamin) der verschiedenen lysosomalen Präparationen dargestellt. Es ist erkennbar, dass innerhalb des dichten oder weniger dichten Pools, eine Homogenität und beim Vergleich dieser beiden Gruppen untereinander eine Heterogenität der Lipidverteilung besteht. In den Proben des dichten Pools liegen die Phosphoglyceride im Durchschnitt zu 60 % und das Cholesterol zu 30 % vor. Im Vergleich zum dichten Pool weisen die Proben des weniger dichten Pools mehr Phosphoglyceride (74 %) und weniger Cholesterol (20 %) auf.

Die prozentuale Verteilung der Lipide im Ausgangsmaterial, der schweren beziehungsweise leichten Fraktionen, entspricht weitgehend der in den Immunoaffinitätsmembranen (jeweilige Affi-Membranen) bestimmten prozentualen Verteilung der Lipide. Bei den Proben des dichten Pools, Ausgangsmaterial beziehungsweise immunoaffinitätsgereinigte Membranen, liegt der Anteil des Cholesterol bei 30.5 beziehungsweise 25 %, der der Phosphoglyceride bei 61.2 beziehungsweise 59.7 % und der des Sphingomyelins bei 8.2 beziehungsweise 15.4 %. Die entsprechende Verteilung der Lipide in den Proben des weniger dichten Pools, des Ausgangsmaterials beziehungsweise der immunoaffinitätsgereinigten Membranen, ist wie folgt: Cholesterol 20.7 beziehungsweise 20.1 %, Phosphoglyceride 73.9 beziehungsweise 73.3 % und Sphingomyelin 5.4 beziehungsweise 6.6 %.

Das Verhältnis des Cholesterols zu den Phospholipiden in den schweren und leichten Fraktionen zeigt deutliche Unterschiede. Bestehen die Membranlipide der leichten Fraktionen etwa zu einem Fünftel aus Cholesterol, so steigt dieser Wert bei den schweren Fraktionen auf fast ein Drittel an. Im Gegensatz dazu sinkt der Phospholipidanteil von etwa 80 % in den leichten Fraktionen auf etwa 70 % in den schweren Fraktionen ab.

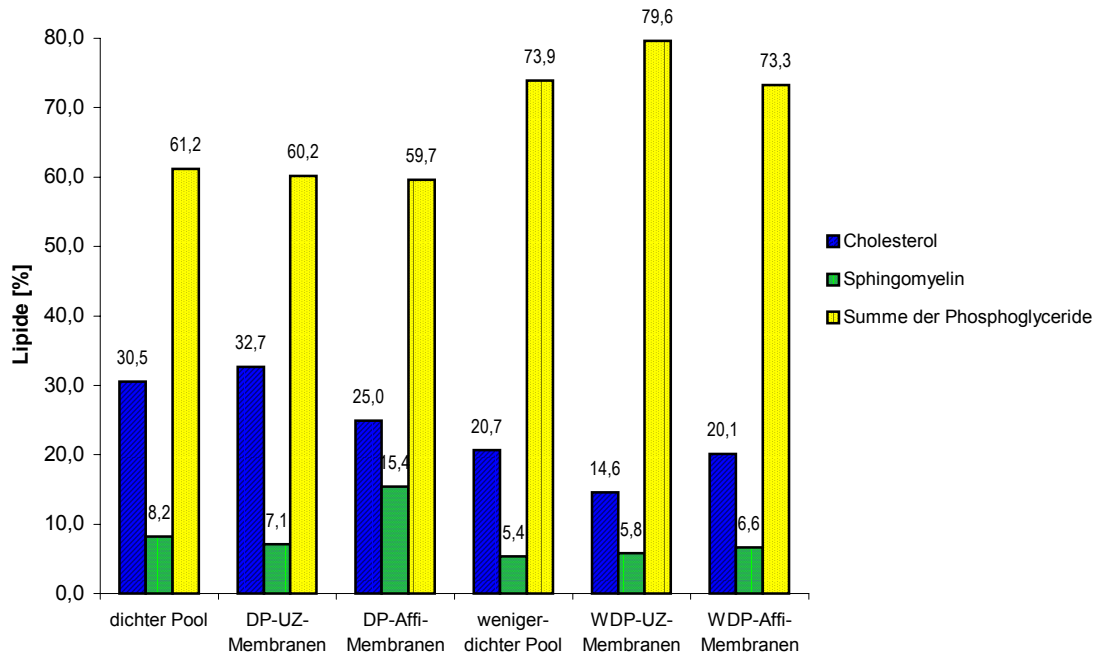


Abb. 4.23: **Prozentuale Verteilung des Cholesterols, des Sphingomyelins und der Summe der Phosphoglyceride (Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylethanolamin) verschiedener lysosomaler Präparationen.** Dargestellt sind die jeweiligen Ausgangsmaterialien (dichter Pool und weniger dichter Pool) sowie ultrazentrifugierte (UZ) und immunoaffinitätsge reinigte (Affi) Membranen der schweren (dichter Pool) und der leichten Fraktionen (weniger dichter Pool).

Mit den beschriebenen Ergebnissen kann gezeigt werden, dass es zwischen den schweren und leichten Membranen Unterschiede bezüglich der Zusammensetzung der Membranlipide gibt. Die schweren Membranen sind verglichen mit den leichten Membranen reicher an Cholesterol, etwa 30 % verglichen mit 20 % der Gesamtlipide, und ärmer an den Phosphoglyceriden, etwa 60 % verglichen mit 74 % der Gesamtlipide.

4.4.2 Zweidimensionale Darstellung schwerer und leichter lysosomaler Membranen

Nachdem in Kapitel 4.4.1 die Lipidzusammensetzung der schweren und leichten Fraktionen des Percoll®-Gradienten dargestellt und verglichen wurde und in Kapitel 4.4.2 die Verteilung der Lipidmenge zur Proteinmenge untersucht wurde, sollen im Folgenden mit Hilfe

der zweidimensionalen Elektrophorese die entsprechenden Proteinmuster ultrazentrifugierter und immunoaffinitätsgereinigter Membranen gegenübergestellt werden, um die Gemeinsamkeiten der schweren und leichten lysosomalen Membranen zu untersuchen.

In Abbildung 4.24 sind zweidimensionale silbergefärbte SDS-Polyacrylamidgele lysosomaler Membranproteine der schweren Fraktionen (Bild A und C) beziehungsweise der leichten Fraktionen (Bild B und D) dargestellt. Es ist eine über 80-prozentige Übereinstimmung im Proteinmuster sowohl bei den ultrazentrifugierten schweren (Bild A) und leichten Membranen (Bild B) als auch bei den immunoaffinitätsgereinigten schweren (C) und leichten Membranen (D) zu erkennen.

Der Vergleich der zweidimensionalen Silbergele der schweren (B und D) mit den zweidimensionalen Silbergele der leichten Membranen (A und C) zeigt wiederkehrende Punktgruppen in allen vier SDS-Polyacrylamidgele. Diese Beobachtung ist unabhängig davon, ob die Membranen durch Ultrazentrifugation oder Immunoaffinitätsreinigung gewonnen wurden. Zur Unterstützung dieser Aussage sind einige Punktgruppen durch Kästchen und eine entsprechende Nummerierung (1-21) hervorgehoben.

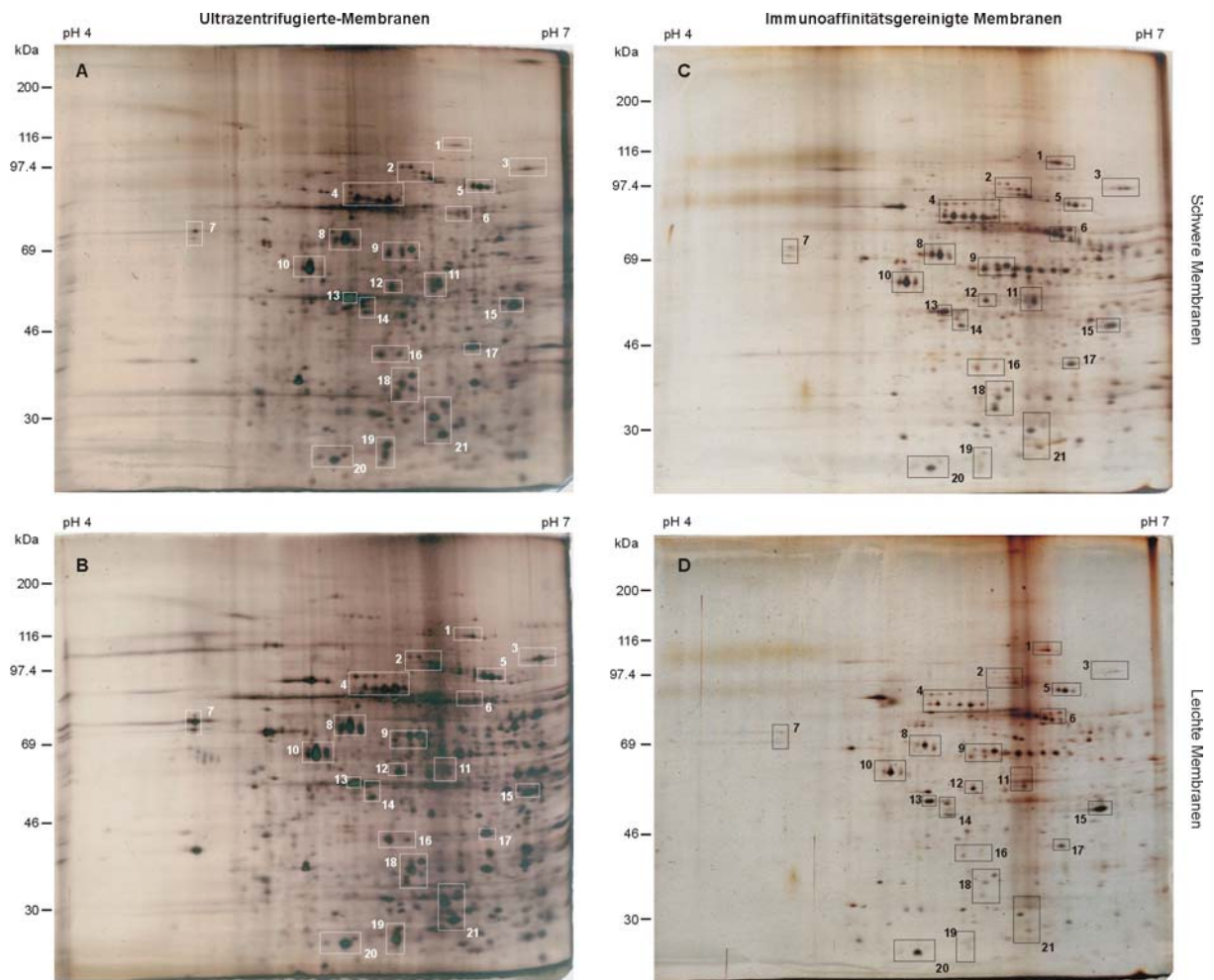


Abb. 4.24: **Zweidimensionale Silbergele lysosomaler Membranproteine der schweren Fraktionen (A und C) beziehungsweise der leichten Fraktionen (B und D).** Die mit einem Kästchen markierten und nummerierten Punktgruppen zeigen eine Auswahl der Proteine, die in allen Proben zu finden sind.

Jeweils 50 µg der ultrasentrifugierten (A und B) beziehungsweise 25 µg der immunoaffinitätsgeinigten Membranen (C und D) wurden in 3,5 % [w/v] CHAPS, 0,5 % [w/v] Nonidet P-40 und 9 M Harnstoff lysiert. Im Anschluss an die isoelektrische Fokussierung in Röhrgelungen wurden die Proteine über ein 12,5 % [w/v] SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und silbergefärbt.

5 Diskussion

5.1 Zweidimensionale Auftrennung lysosomaler Membranproteine

Bei der zweidimensionalen Elektrophorese handelt es sich nach wie vor um die klassische Methode zur Trennung komplexer Proteingemische. In der ersten Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der zweiten nach ihrem Molekulargewicht getrennt (Westermeier, 2001).

Für die isoelektrische Fokussierung stehen zwei Methoden zur Verfügung. Einerseits die Röhrengelle nach O'Farrell (1975) mit Trägerampholyten und andererseits die immobilisierten pH-Gradienten nach Bjellqvist et al. (1982).

Bei Trägerampholyten handelt es sich um heterogene Synthesegemische aus mehreren hundert unterschiedlichen niedermolekularen aliphatischen Oligoamino-Oligocarbonsäuren, die sich in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden. Die Qualität der Ampholyte ist von entscheidender Bedeutung für die Reproduzierbarkeit der isoelektrischen Fokussierung (IEF). In noch nicht fokussierten Röhrengellen herrscht ein einheitlicher pH-Wert. Der pH-Gradient bildet sich erst nach Anlegen eines elektrischen Feldes. Beim immobilisierten pH-Gradienten wird ein Gradient aus bifunktionellen Acrylamidderivaten mit pufferndem sauren und basischen Rest auf eine Kunststoffmatrix aufgebracht. Diese Acrylamidderivate werden auch als ImmobilineTM bezeichnet (Berkelmann und Stenstedt, 1998).

Dass sich die Methode des immobilisierten pH-Gradienten durchgesetzt hat, basiert unter anderem auf der größeren Reproduzierbarkeit der ersten Dimension, einer hohen Auflösung bei engen, gut definierten pH-Gradienten, einer höheren Ladekapazität im mikropräparativen Maßstab und auf weniger anspruchsvolleren technischen Fähigkeiten des Anwenders (Berkelman und Stenstedt, 1998; Görg et al., 1997). Ein wirkliches Problem der Verwendung von selbstgegossenen Röhrengellen mit Trägerampholyten ist die Kathodendrift und der daraus folgende Verlust basischer Polypeptide (O'Farrell, 1975). Ein pH-Gradient mit Trägerampholyten kommt über einen pH-Bereich von 7.5 bis 8.0 nicht hinaus. Beim Versuch basische pH-Gradienten laufen zu lassen geht sowohl die Stabilität des pH-Gradienten als auch die des Röhrchens verloren (Rabilloud, 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurden für die zweidimensionale Trennung der lysosomalen Membranproteine beide Methoden getestet (siehe Kapitel 4.2.1). Es zeigen sich deutliche Unterschiede bei der Proteinausbeute und der Wiederfindungsrate (Abbildung 5.1) sowohl bei Probenmengen im analytischen (25 µg Protein; Abbildung 5.1 A und B) als auch bei

Probenmengen im präparativen Maßstab (250 µg Protein; Abbildung 5.1 C und D). Nur bei Verwendung von Röhrchengelen mit Trägerampholyten sind in einem Bereich von etwa pH 6.0 bis 7.0 Proteine detektierbar. Unabhängig vom pH-Bereich ist bei dieser Methode ab einem Molekulargewicht von etwa 30 kDa die Anzahl der detektierbaren Proteine deutlich höher als bei dem immobilisierten pH-Gradienten. Je höher das Molekulargewicht, desto deutlicher ist der Unterschied.

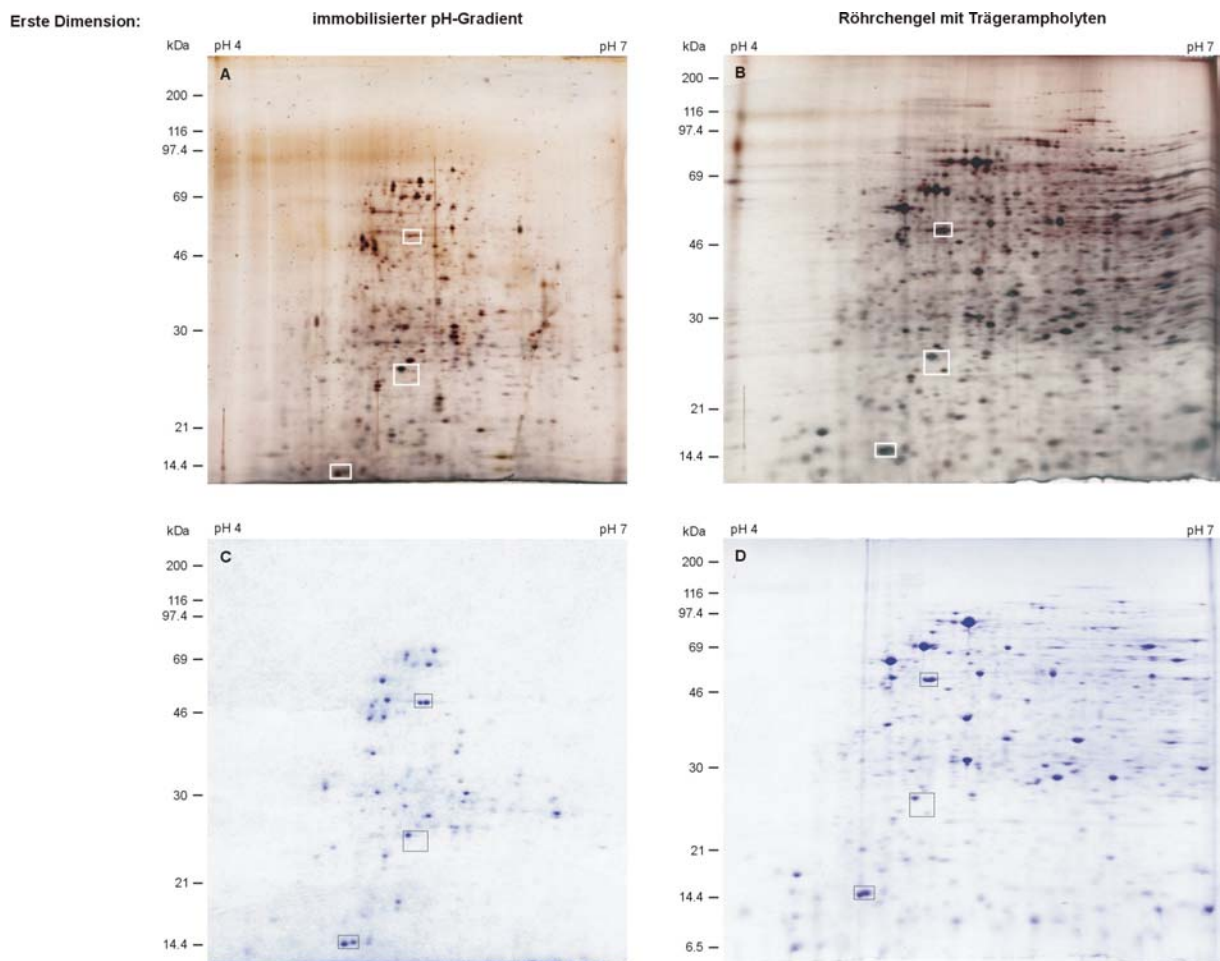


Abb. 5.1: **Zweidimensionale Darstellung ultrazentrifugierter lysosomaler Membranproteine. Die isoelektrische Fokussierung wurde bei Bild A und C mit immobilisiertem pH-Gradienten und bei Bild B und D mit Trägerampholyten durchgeführt.** Bei den silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgelen A und B wurde 25 µg Protein und bei den Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen wurde 250 µg Protein aufgetragen. Durch Kästchen werden jeweils identische Proteingruppen markiert.

Die dargestellten Ergebnisse unterstützen die Aussagen von Adessi et al. (1997). Sie berichten bei der Auftrennung von Membranproteinen mit Hilfe immobilisierter pH-Gradienten von einer sehr guten Auflösung, jedoch unter deutlichen Proteinverlusten. Diese Proteinverluste werden der Adsorption von Proteinen an die Matrix des immobilisierten pH-

Gradienten in seiner Nähe oder am isoelektrischen Punkt zugeschrieben (Adessi et al., 1997).

Allgemein wird versucht, über die Wahl geeigneter Detergenzien die Löslichkeit der Membranproteine in der ersten Dimension (IEF-Streifengele) zu verbessern und einen effizienten Transfer in die zweite Dimension (SDS-Polyacrylamidgel) zu erreichen (Rabilloud et al., 1999; Chevalet et al., 1998; Molloy et al., 1998). Die Kombination von Harnstoff und CHAPS reicht nicht aus, um Membranproteine vollständig in Lösung zu bekommen (Simões-Barbosa et al., 2000). Die Löslichkeit von Membranproteinen im analytischen Bereich wird von Pasquali et al. (1997) als unproblematisch beschrieben. Die im Gegensatz dazu im präparativen Maßstab zu beobachtenden Präzipitationen können nur durch Zusatz von Thioharnstoff verhindert werden (Pasquali et al., 1997).

Im Verlauf der Arbeit mit lysosomalen Membranproteinen hat sich beim Einsatz von Röhrchengelen mit Trägerampholyten gezeigt, dass der Zusatz von 0.5 % eines anionischen Detergens zur Verbesserung der Löslichkeit hochmolekularer (Nonidet P-40) und saurer Membranproteine (Triton X-100) führt. Vor allem im präparativen Maßstab konnte die Präzipitation saurer Proteine durch Zusatz von 0.5 % Triton X-100 deutlich reduziert werden.

Die gezeigten Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass für die zweidimensionale Auftrennung von Membranproteinen nicht nur die Wahl geeigneter Detergenzien, sondern auch die Wahl der Methode zur isoelektrischen Fokussierung die Wiederfindungsrate deutlich verbessert.

Über diese Ergebnisse hinaus konnte gezeigt werden, dass beim Einsatz von Röhrchengelen mit Trägerampholyten reproduzierbare zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgele (Abbildung 5.2) mit linearem pH-Gradienten (Abbildung 4.2) hergestellt werden können. Diese Reproduzierbarkeit ist, wie eingangs bereits erwähnt wurde, sehr wahrscheinlich auf die Güte der eingesetzten Trägerampholyte zurückzuführen.

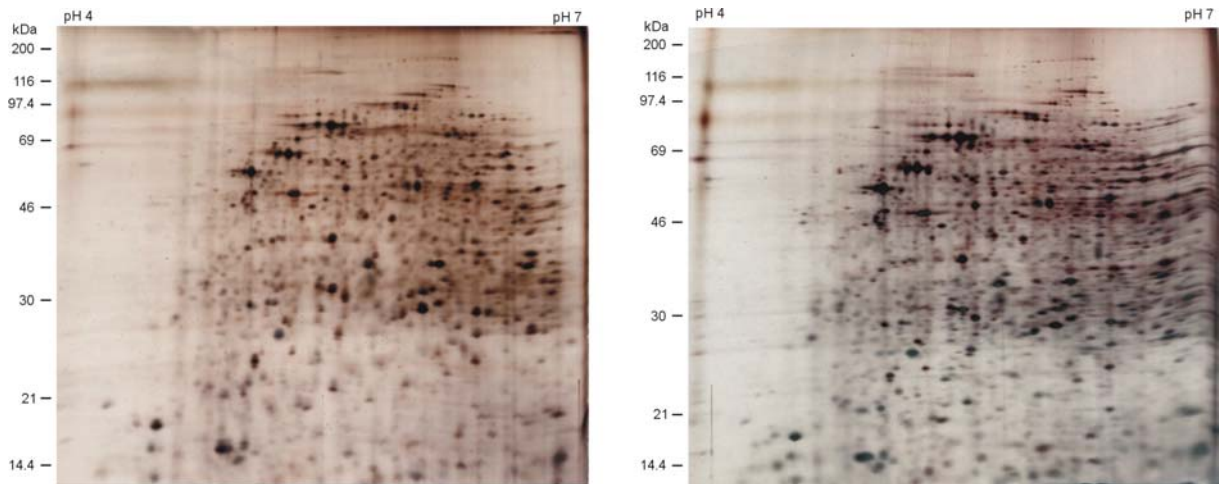


Abb. 5.2: **Zweidimensionale silbergefärbte SDS-Polyacralamidgele, die im Abstand mehrerer Monate unter sonst identischen Bedingungen einschließlich des Probenmaterials hergestellt wurden.**

In einem pH-Bereich bis etwa 7.5 stellt die isoelektrische Fokussierung in Röhrchengelen mit Trägerampholyten die geeignete Methode zur Trennung von Membranproteinen dar. Aufgrund des Phänomens der Kathodendrift, bei der das basische Ende des pH-Gradienten mit steigenden Voltstunden zusammenbricht, was zum Auswandern basischer Proteine aus dem Gel führt (Rabilloud, 1994), ist diese Methode nicht geeignet, Proteine mit einem basischen isoelektrischen Punkt zu fokussieren. Aus diesem Grund wurde zur Trennung basischer Proteine die Methode der „nonequilibrium isoelectric focusing“ entwickelt (O’Farrell et al., 1977). Diese „nonequilibrium pH-gradient gelelectrophoresis“ (NEPHGE), die nur kurze Fokussierungszeiten verwendet, lässt zwar die Trennung, aber keine Charakterisierung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt zu (O’Farrell, 1977).

Nachdem Röhrchengele mit Trägerampholyten nur in einem begrenzten pH-Bereich einsetzbar sind, aber hochmolekulare und basische Membranproteine an die Matrix des immobilisierten pH-Gradienten adsorbieren, stellt sich die Frage, ob nicht die Kombination beider Methoden hilfreich wäre. Hirano et al. (2000) verwendeten Röhrchengele unter Einsatz von Trägerampholyten und eines Gradienten aus ImmobilenTM. Die Autoren schreiben, dass es verglichen mit entsprechenden IEF-Streifengelen möglich war, größere Mengen Protein aufzutrennen. Die abgebildeten zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgele lassen allerdings keine eindeutige Bestätigung dieser Aussage zu. Trotzdem könnte in der weitergehenden Variation dieser Methode eine Möglichkeit zur Auftrennung und Charakterisierung lysosomaler Membranproteine über einen pH-Bereich von pH 7.5 hinausgehend liegen.

Unabhängig von der Wahl der Methode müssen letztendlich für jedes Protein die Bedingungen optimiert werden (Rabilloud et al., 1997).

5.2 Charakterisierung der lysosomalen Membran

Über die zweidimensionale elektrophoretische Trennung lysosomaler Membranproteine berichteten Dietrich et al. (1996) erstmals. Sie trennten aus humaner Plazenta und radioaktiv markierten humanen Hautfibroblasten isolierte lysosomale Membranproteine auf und identifizierten drei lysosomale Membranproteine. Der Nachweis des LAMP-2 wurde mittels Immunoblotting und der des CD63/ LIMP I beziehungsweise der kleinen (α -)Untereinheit der sauren Ceramidase über Immunpräzipitation der entsprechenden Proteine aus den markierten Hautfibroblasten erbracht.

Chataway et al. (1998) setzten zur zweidimensionalen elektrophoretischen Trennung ebenfalls aus humaner Plazenta isolierte lysosomale Membranproteine ein. Die geringe Wiederfindungsrate der über immobilisierte pH-Gradienten aufgetrennten Membranproteine (Adessi et al., 1997) veranlasste die Gruppe um Chataway für die isoelektrische Fokussierung lysosomaler Proteine Röhrenchengele mit Trägerampholyten zu verwenden. Mit Hilfe der im Anschluss an die zweidimensionale elektrophoretische Trennung durchgeführten N-terminale Sequenzierung konnten vier Proteine der lysosomalen Membran nachgewiesen werden. Es handelte sich um LAMP-1 und drei weitere Proteine, die nicht den lysosomalen Membranproteinen zugeordnet werden. Dass es sich hierbei lediglich um eine Kontamination durch fremde Organellen handelt, schließen die Autoren weitgehend aus (Meikle et al., 1995).

5.2.1 Natriumcarbonat-Behandlung

Die Proteine der lysosomalen Membran setzen sich aus integralen und peripheren Membranproteinen zusammen. Die integralen Membranproteine besitzen mindestens einen die Phospholipiddoppelschicht durchspannenden Molekülabschnitt oder sind über einen Lipidanker, der nur in einer der beiden Schichten verankert ist, in die Membran integriert. Die peripheren Membranproteine werden an integrale Proteine über Ionenbindung beziehungsweise andere schwache Wechselwirkungen gebunden oder werden durch die polaren Kopfgruppen der Lipide fixiert (Chou und Elrod, 1999). Aufgrund dieser physikalischen Bindung lassen sich die peripheren Membranproteine durch hohe Ionenstärke und einen alkalischen pH-Wert von der Membran ablösen. Dabei ist der pH-Wert von größerer Bedeutung als die Ionenstärke. Der pH-Wert sollte bei mindestens pH 11.0 liegen (Fujiki et al., 1982a).

Über die Fraktionierung von Lysosomen in das Kompartiment der Membranproteine und das der luminalen Proteine – lösliche einschließlich membranassoziierter – mit Hilfe der Natriumcarbonat-Behandlung wurde berichtet (Madden et al., 1987). In beiden Kompartimenten konnten 20 bis 30 Banden in einem Molekulargewichtsbereich von 18 bis 200 kDa nachgewiesen werden, die sich nur in wenigen Fällen überschneiden. Untersuchungen an Phagosomen zeigten, dass das lysosomal assoziierte Membranprotein 2 (LAMP-2) ausschließlich im Niederschlag detektierbar ist (Burkhardt et al., 1995). In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, dass es sich bei LAMP-2 nicht, wie fälschlicherweise aufgrund des Namens angenommen werden könnte, um ein assoziiertes Protein handelt. LAMP-2 ist ein Typ I Membranprotein mit einem die Phospholipiddoppelschicht durchspannenden Molekülteil (Abbildung 5.3).

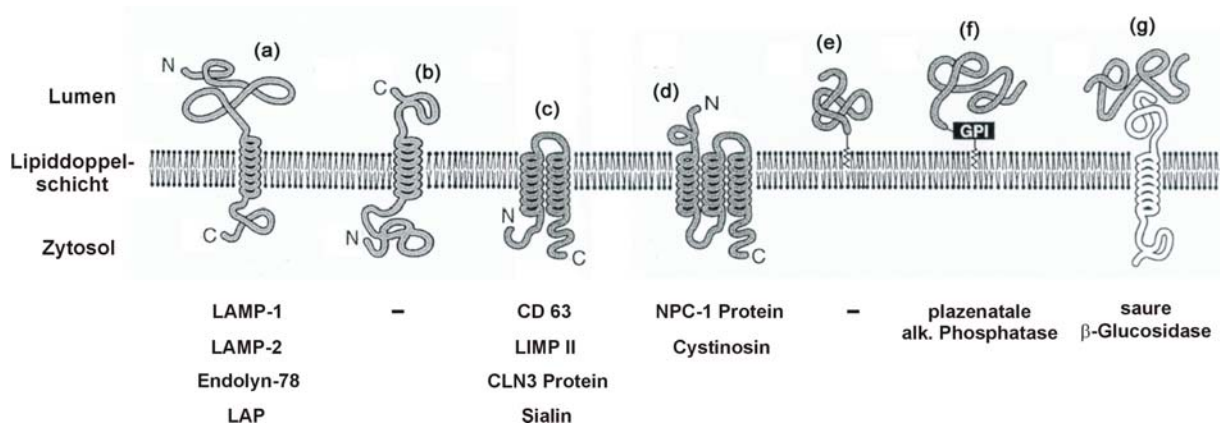


Abb. 5.3: Schematische Darstellung von Membranproteinen: (a) Typ I Transmembranprotein, (b) Typ II Transmembranprotein, (c) Typ III Transmembranprotein: Membranprotein mit mehreren Transmembrandomänen (multipass) und N- und C-Terminus im Zytosol, (d) Membranprotein mit mehreren Transmembrandomänen (multipass), sowie dem N-Terminus im Lumen und dem C-Terminus im Zytosol, (e) Membranprotein mit Lipidanker, (f) Membranprotein mit GPI-Anker und (g) peripheres Membranprotein (modifiziert nach Chou und Elrod (1999) und Wickner und Lodish (1986)). Die Aminosäuresequenz und Topologie der entsprechenden Proteine wurde beschrieben: LAMP-1 und LAMP-2 (Fukuda et al., 1988), Endolyn-78 (Ihrke et al., 2000), LAP (Pohlmann et al., 1988; Waheed et al., 1988), CD63 (Metzelaar et al., 1991; Peters und Figura 1994), LIMP II (Fujita et al., 1992; Fukuda, 1991), CLN3 Protein (The International Batten Disease Consortium, 1995; Janes et al., 1996), Sialin (Verheijen et al., 1999), NPC-1 Protein (Carstea et al., 1997; Davies und Ioannou 2000), Cystinosin (Town et al., 1998; Cherqui et al., 2001), plazentale alkalische Phosphatase (Snyers et al., 1999; Millan, 1986), saure β -Glucosidase (Sorge et al., 1985)

Die im Anschluss an eine Natriumcarbonat-Behandlung im Niederschlag zu detektierenden Proteine werden von Pasquali et al. (1997) als Transmembranproteine definiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass 90 % der mit Natriumcarbonat behandelten Proteine sedimentierbar sind (Abbildung 4.7). Unter ihnen befindet sich auch LAMP-2 und die N-Acetyltransferase (Kapitel 4.2.6). Bei den Proteinen, die sowohl im Überstand als auch im Niederschlag nachweisbar sind, handelt es sich um periphere Membranproteine. Keines

dieser silberfärbbaren, membranassoziierten Proteine konnte durch die Natriumcarbonat-Behandlung vollständig von der Membran gelöst werden. Da es bei dieser Methode zu keiner Zerstörung der Membranstruktur kommt (Fujiki et al., 1982b), wird davon ausgegangen, dass die Proteine in Abhängigkeit von der Stärke der Ionenbindung in Lösung gehen, d.h. je schwächer die ionische Wechselwirkung, desto stärker das im Überstand auf dem silbergefärbten, zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgel detektierbare Signal und entsprechend schwächer das Signal im Niederschlag.

Madden et al. (1987) fanden deutlich mehr Proteine im Überstand, da sie die Natriumcarbonat-Behandlung mit den gesamten Lysosomen und nicht nur mit gereinigten Membranproteinen durchführten. Daraus folgend befinden sich in diesem Überstand lösliche Proteine und periphere Membranproteine.

Zur Unterscheidung der integralen Membranproteine in Transmembranproteine mit einer oder mehreren Transmembrandomänen von Membranproteinen mit einem Lipidanker, zum Beispiel der plazentalen alkalischen Phosphatase (Snyers et al., 1999), müsste an die Natriumcarbonatbehandlung eine Phospholipasebehandlung angeschlossen werden.

5.2.2 Glykosylierung

Die Membran der Lysosomen enthält stark glykosylierte Transmembranproteine mit weitgehend unbekannter Funktion (Hunziker und Geuze, 1996). Die bisher bekannten lysosomalen Membranproteine tragen zum größten Teil mit Asparagin verknüpfte Oligosaccharide vom komplexen Typ mit endständigen Sialinsäureresten (Akasaki et al., 1992; Croze et al., 1989; Mane et al., 1989; Carlsson et al., 1988; Rupar und Whitehall, 1988; Barriocanal et al., 1986; Lippincott-Schwartz und Fambrough, 1986; Lewis et al., 1985). Aufgrund des hohen Gehaltes an Neuraminsäureresten (Sialinsäureresten) der Oligosaccharide haben die lysosomalen Membranproteine einen sauren isoelektrischen Punkt (Chataway et al., 1998; Granger et al., 1990; Lewis et al., 1985). Die Glykoproteine sind stark bezuckert, so dass das Peptidgrundgerüst der Proteine teilweise weniger als 50 % des gesamten Molekulargewichts ausmacht (Croze et al., 1989; Mane et al., 1989; Carlsson et al., 1988; Barriocanal et al., 1986; Lippincott-Schwartz und Fambrough, 1986; Lewis et al., 1985).

Von den zweidimensional dargestellten immunoaffinitätsgereinigten lysosomalen Membranproteinen tragen mehr als 10 % mit Asparagin verknüpfte Oligosaccharide (Abbildung 4.8 A). Die Anzahl der deglykosylierten und somit neu aufgetretenen Proteine ist deutlich höher (Abbildung 4.8 B). Hierfür werden zwei mögliche Gründe diskutiert: es ist bekannt, dass glykosylierte Proteine teilweise schlecht färbbar beziehungsweise silberfärbbar sind

(Gradilone et al., 1998; Jay et al., 1990; Fairbanks et al., 1971). Die Differenz in der Anzahl der durch die Peptid N-Glycosidase F deglykosylierbaren (23 Proteine) und der deglykosylierten Proteine (33 Proteine) könnte somit durch eine veränderte Silberfärbbarkeit erklärt werden. Des Weiteren ist es möglich, dass deglykosylierte Proteine besser in die erste Dimension (Röhrchengel mit Trägerampholyten) einwandern. Die Dimerisierung lysosomaler Membranproteine über ihre N-Glykane wurde beschrieben (Croze et al., 1989). Daraus folgend ist zu vermuten, dass es zwischen den Oligosaccharidseitenketten der Membranproteine zu Interaktionen kommt, die letztendlich zu einer „glykokalyxartigen“ Struktur führt, die bei intakten Zellen dem Schutz vor proteolytischem Verdau dient (Kundra und Kornfeld, 1999). Teile dieser Struktur können wahrscheinlich unter den vorliegenden Lysebedingungen nicht vollständig aufgelöst werden, so dass die Proteine am Auftragspunkt „liegen bleiben“ und nicht in die erste Dimension einwandern. Eine Spaltung N-gebundener Oligosaccharidseitenketten schlecht lysierbarer Proteine würde demzufolge dazu führen, dass diese Proteine unter den gegebenen Bedingungen in Lösung gehen und bleiben und folglich isoelektrisch fokussiert werden können. Es wurde gezeigt, dass nur etwa 50 % des über Western-Blot nachgewiesenen LAMP-2 (Abbildung 4.5) fokussiert wurde, wohingegen der Rest dieses glykosylierten Membranproteins (Fukuda, 1991; Carlsson et al., 1988) am Auftragspunkt zu einem deutlichen Signal führte. Somit konnte im Verlauf der Fokussierung also nur ein Teil des LAMP-2 in Lösung gehalten werden. Im Vergleich dazu zeigt sich, dass die für die zweite Dimension durchgeführte Beladung mit SDS den Aufschluss dieser „Glykokalyx“ ermöglicht, und die Proteine aus dem fokussierten Röhrchen in das SDS-Polyacrylamidgel einwandern können.

Etwa 20 % der 230 gut detektierbaren lysosomalen Membranproteine reagieren sensitiv auf die Neuraminidasebehandlung (Abbildung 4.9 A). Die Anzahl der sialylierten Membranproteine ist etwa doppelt so hoch wie die Zahl der Membranproteine, die im Anschluss an die enzymatische Behandlung neu auftreten.

Die N-Acetylneuraminsäure trägt durch ihre negative Ladung am Carboxylrest zu einer negativen Nettoladung der Glykoproteine bei. Werden diese Zucker entfernt, so kann es folglich zu einer deutlichen Verschiebung des isoelektrischen Punktes kommen, mit der Konsequenz, dass desialylierte Proteine einen isoelektrischen Punkt außerhalb des fokussierten und damit darstellbaren Bereichs haben. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die isoelektrische Fokussierung von pH 4.0 bis 7.0.

Für die reife Form des LAMP-1 wird ein isoelektrischer Punkt von pH 4.5 bis 5.2 (Chataway et al., 1998), von pH 4.1 bis 7.0 (Chen et al., 1985) beziehungsweise von etwa 4.0 bis

5.0 (Barriocanal et al., 1986) beschrieben. Der des desialysierten Proteins liegt etwa zwischen pH 8.8 bis 9.3 (Barriocanal et al., 1986). Im Vergleich dazu liegt der theoretische, sich aus der Aminosäuresequenz errechnete, isoelektrische Punkt bei pH 9.22 (Datenbank: SwissProt). Unter den vorliegenden Bedingungen ist folglich das glykosylierte, nicht aber das desialylierte beziehungsweise N-deglykosylierte Protein zweidimensional darstellbar.

Die nacheinander durchgeführte Spaltung von Neuraminsäuren und N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidseitenketten zeigt, dass es sich bei etwa 25 % der zweidimensional dargestellten lysosomalen Membranproteine um Glykoproteine handelt. Es gibt Glykoproteine, die ausschließlich Peptid N-Glycosidase F sensitiv sind (Tabelle 4.3), was auf Membranproteine mit an Asparagin geknüpften Zuckerketten vom mannosereichen Typ schließen lässt. Von den identifizierten Glykoproteinen tragen fast 15 % Neuraminsäurereste und N-Glykane. Sie verfügen wahrscheinlich über N-glykosidisch gebundene Oligosaccharidseitenketten vom komplexen Typ oder O-Glykane mit Neuraminsäureresten (Kornfeld und Kornfeld, 1985).

Bei den in Abbildung 5.4 dargestellten nummerierten lysosomalen Membranproteinen handelt es sich mit Ausnahme der Proteine 4, 38-40 um glykosylierte Proteine. Nachdem es sich bei allen bisher identifizierten lysosomalen Membranproteinen um Glykoproteine handelt (Hunziker und Geuze, 1995), gelten diese markierten Proteine als potentielle Kandidaten für lysosomale Membranproteine. Diese Hypothese wurde auch von P. Saftig (2001) unterstützt.

Aufgrund der Sauberkeit des verwendeten Probenmaterials (Kapitel 4.1) wird, vergleichbar mit den Ergebnissen von Chataway et al. (1998), nicht davon ausgegangen, dass es sich bei allen nicht glykosylierten Proteinen lediglich um eine Kontamination durch fremde Organellen handelt. Eine mögliche Erklärung bietet ein Postulat von Cuervo, Dice und Knecht (1997). Es besagt, dass einige der Proteine, die in der lysosomalen Membran gefunden werden, Bestandteile des selektiven Proteinimportes sind und auf dem Weg vom Zytosol in das Lumen der Lysosomen über einen gewissen Zeitraum in die lysosomale Membran integriert werden.

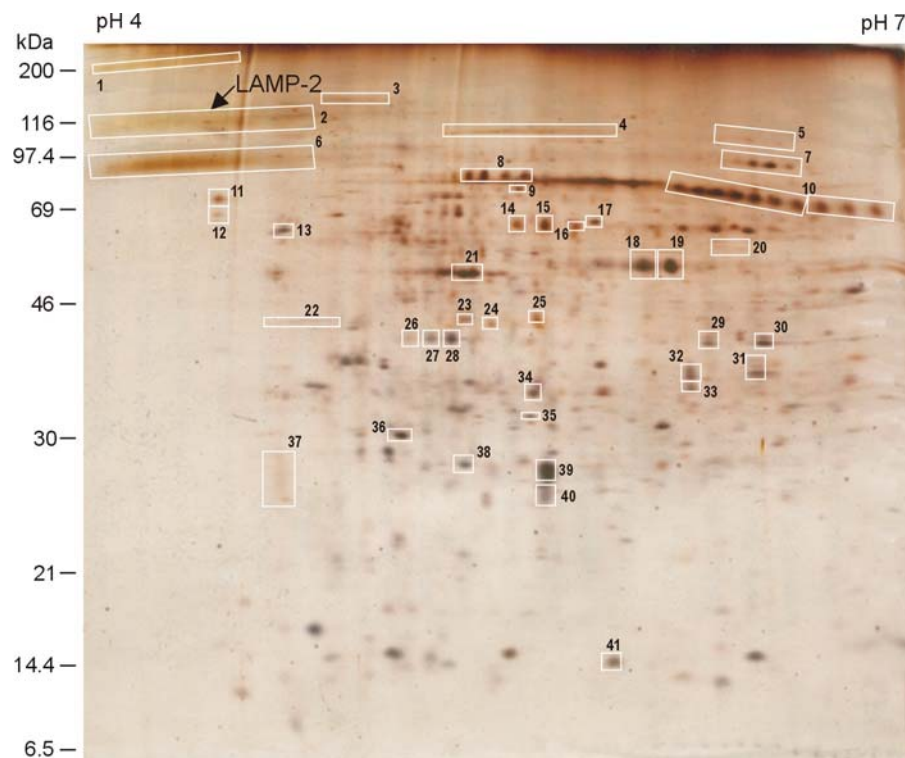


Abb. 5.4: **Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine.** Mit Zahlen von 1 bis 41 sind Proteine oder Proteingruppen markiert, die Neuraminsäurereste tragen und/oder an Asparagin gebundene Oligosaccharidseitenketten besitzen (identisch mit Abbildung 4.11).

Der isoelektrische Punkt von LAMP-2 wird mit pH 3.5 bis pH 7.0 (Diettrich et al., 1996) beziehungsweise pH 4.1 bis 5.2 (Chen et al., 1985) beschrieben. Als apparentes Molekulargewicht werden 100 bis 110 kDa (Chen et al., 1985) beziehungsweise 110 bis 120 kDa (Diettrich et al., 1996) angegeben. Nachdem es erstmals gelungen ist, Coomassie-Brilliant-Blau färbbare Mengen lysosomalen Membranproteins zweidimensional aufzutrennen (Abbildung 4.4), konnte LAMP-2 (Nummer 2) über Western-Blotting identifiziert und charakterisiert werden. LAMP-2 hat ein apparentes Molekulargewicht von 100 bis 110 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 4.2 bis 4.7 (Abbildung 4.5). Die in der Literatur beschriebene Charakterisierung bezüglich der Glykosylierung von LAMP-2 (Fukuda, 1991; Carlsson et al., 1988) konnte bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass das aus der humanen Plazenta isolierte LAMP-2 sowohl N-Acetylneuraminsäuren als auch N-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharidseitenketten trägt. LAMP-2 gilt als das häufigste Sialoglykoprotein der Zelle (Fukuda, 1991).

Informationen zur Aufgabe und Funktion der lysosomalen Membranproteine stammen häufig indirekt aus der Entdeckung von lysosomalen Speicherkrankheiten, die durch Schädigung des entsprechenden Proteins verursacht werden. Zu den Defekten der lysosomalen

Membran zählt unter anderem die Sialinsäurespeicherkrankheit (Verheijen et al., 1999) und die Cystinose (Town et al., 1998), die verursacht werden durch die lysosomale Speicherung des namensgebenden Stoffwechselendprodukts. Tanaka et al. (2000) konnten zeigen, dass ein Defekt des LAMP-2 zur Danon-Krankheit führt (Danon et al., 1981). Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung, die mit einer Kardiomyo- und Myopathie einhergeht (Nishino et al., 2000; Danon et al., 1981). Eine weitere Erkrankung, die mit dem Defekt eines lysosomalen Membranproteins in Verbindung gebracht wird, ist Niemann-Pick Typ C.

5.2.3 Niemann-Pick Typ C-1 Protein

Nach Brown und Goldstein (1986) sind die Lysosomen das einzige Organell, das Low-Density-Lipoprotein (LDL) schnell und vollständig abbauen kann. Das LDL bindet über den LDL-Rezeptor in Clathrin umhüllten Membraneinstülpungen (clathrin coated pits) an der Zelloberfläche, wird endozytiert und in Clathrin umhüllten Vesikeln transportiert. Nach der Dissoziation der Clathrinhülle gelangt der LDL-Rezeptor-Komplex in die Endosomen. Durch eine Adenosintriphosphat getriebene Protonenpumpe kommt es in den Endosomen zum Absinken des pH-Wertes unter 6.5, was zur Ablösung des LDL-Partikels vom LDL-Rezeptor führt. Letzterer kehrt wieder zur Zelloberfläche zurück. Es schließt sich eine Fusion des Endosoms mit „primären“ Lysosomen an. In diesen (sekundären) Lysosomen, den späten Endosomen beziehungsweise den so genannten „multivesikulären Bodies“ (MVB) beginnt die Hydrolyse des LDL unter Bildung von Aminosäuren und Cholesterol (Liscum, 2000; Brown und Goldstein, 1986). Dieses Cholesterol muss nun als nicht modifiziertes hydrophobes Molekül von den Lysosomen über die wässrige Umgebung der Zelle zum Ort des Stoffwechsels gelangen (Pentchev et al., 1994).

Bei der so genannten Niemann-Pick Typ C (NPC) Krankheit kommt es zur Ansammlung dieses nichtveresterten Cholesterols in den späten Endosomen (Kobayashi et al., 1999) und den Lysosomen (Butler et al., 1992; Pentchev et al., 1986b; Vanier, 1983). Es handelt sich somit bei dieser Erkrankung nicht nur um eine lysosomale, sondern auch um eine endosomale Speicherkrankheit (Kobayashi et al., 1999). Bei der Niemann-Pick Typ C Krankheit ist der Transport zwischen dem hydrolytischen Kompartiment, der Plasmamembran, und dem endoplasmatischen Retikulum, dem Ort der Synthese des Cholesterolesters, gestört (Morris und Carstea, 1998). Über die Funktion des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins (NPC-1 Protein) ist noch wenig bekannt. Untersuchungen haben gezeigt, dass es in Vesikeln vorkommt, die mit Cholesterol gefüllten Lysosomen assoziiert sind (Neufeld et al., 1999). Das NPC-1 Protein vermittelt wahrscheinlich einen retrograden vesikulären Transport des Cholesterols aus den Lysosomen zur Plasmamembran (Neufeld et al., 1999) und zum Trans-Golgi-

Netzwerk (Higgins et al., 1999). Es gilt als erwiesen, dass die über diese NPC-1 Vesikel transportierten Substanzen sich nicht nur auf das Sterol beschränken (Neufeld et al., 1999). Es ist bekannt, dass es bei Defekten des NPC-1 Proteins neben der Anhäufung des Cholesterols auch zur Speicherung von Sphingomyelin und Glycolipiden kommt (Vanier et al., 1996; Pentchev et al., 1986b; Pentchev et al., 1984; Vanier, 1983). Folglich ist davon auszugehen, dass bei Defekten des NPC-1 Proteins auch der intrazelluläre Transport von Glykolipiden und Sphingomyelin gestört ist. Jedoch ist der Mechanismus einer wahrscheinlichen Kopplung des Transports diverser Lipide und des Cholesterols bisher nicht aufgeklärt worden (persönliche Mitteilung A. Hasilik).

Neue Untersuchungen geben erste Hinweise darauf, dass das NPC-1 Protein nicht, wie bisher vermutet wurde, am Transport des LDL-Cholesterols von den Lysosomen zur Plasmamembran, sondern am Transport dieses Cholesterols von der Plasmamembran zu den Lysosomen beteiligt ist (Lange et al., 2000; Cruz et al., 2000).

Der Transport von neusynthetisiertem, endogenem Cholesterol ist unabhängig vom NPC-1 Protein (Liscum et al., 1989). Er führt vom Ort der Synthese, dem endoplasmatischen Retikulum, direkt zur Plasmamembran (Liscum et al., 1989). Eine cholesterolreiche Diät führt zu einer massiven Lebervergrößerung und einer Speicherung nichtveresterten Cholesterols (Pentchev et al., 1984). Dies sind Symptome, die auch bei der NPC Krankheit beobachtet werden können. Es stellt sich die Frage, ob eine cholesterolarme Diät zur Reduktion des LDL-Cholesterols den Verlauf der NPC-1 Krankheit verlangsamen oder gar beenden könnte. Diese Hypothese wurde in Tierversuchen widerlegt. Eine cholesterolarme Diät hat keinen Einfluss auf den fortschreitenden neurodegenerativen Verlauf der Niemann-Pick Typ C Krankheit (Somers et al., 2001).

Die Aufklärung der Aminosäuresequenz im Jahr 1997 hat gezeigt, dass das NPC-1 Protein eine Region mit einer großen Homologie zur Sterol sensitiven Domäne (SSD) der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Reduktase (HMG-R), dem „sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein“ (SCAP) und zum Morphogenrezeptor „Patched“ hat (Carstea et al., 1997). Davies und Ioannou (2000) bewiesen, dass die Orientierung der sterolsensitiven Domäne des NPC-1 Proteins der des HMG-R und des SCAP sehr ähnlich ist, so dass dieser Domäne eine funktionelle Bedeutung zugeschrieben wird (Watari et al., 1999b).

Das NPC-1 Protein wurde in humanen Fibroblasten (Carstea et al., 1997), im Gehirn von Affen (Patel et al., 1999) und in transfizierten Zellen nachgewiesen (Cruz et al., 2000; Watari

et al., 2000). Es handelt sich um ein Membranprotein mit 13 Transmembrandomänen, einem luminalen Aminoterminus und einem zytosolischen carboxyterminalen Rest (Davies und Ioannou, 2000; Abbildung 5.5) mit Dileucin-Motiv (Carstea et al., 1997). Dieses Motiv liegt bei Proteinen vor, die für späte endozytotische Kompartimente bestimmt sind (Hunziker und Geuze, 1996). In der aus 1278 Aminosäuren bestehenden Sequenz des NPC-1 Proteins können 14 potentielle Erkennungssequenzen für N-glykosidische Bindungen bestimmt werden (Carstea et al., 1997). Das theoretische Molekulargewicht liegt bei 142 kDa (Carstea et al., 1997). Watari et al. (1999b) detektierten im Anschluss an eine Tunicamycin-Behandlung von Hamsteroarzellen ein Protein von 140 kDa. Für die reife Form des NPC-1 Proteins wird ein Molekulargewicht von 165 kDa (Patel et al., 1999), 170 kDa (Watari et al., 1999a; Watari et al., 1999b) und 190 kDa (Higgins et al., 1999; Watari et al., 1999a; Watari et al. 1999b) beschrieben.

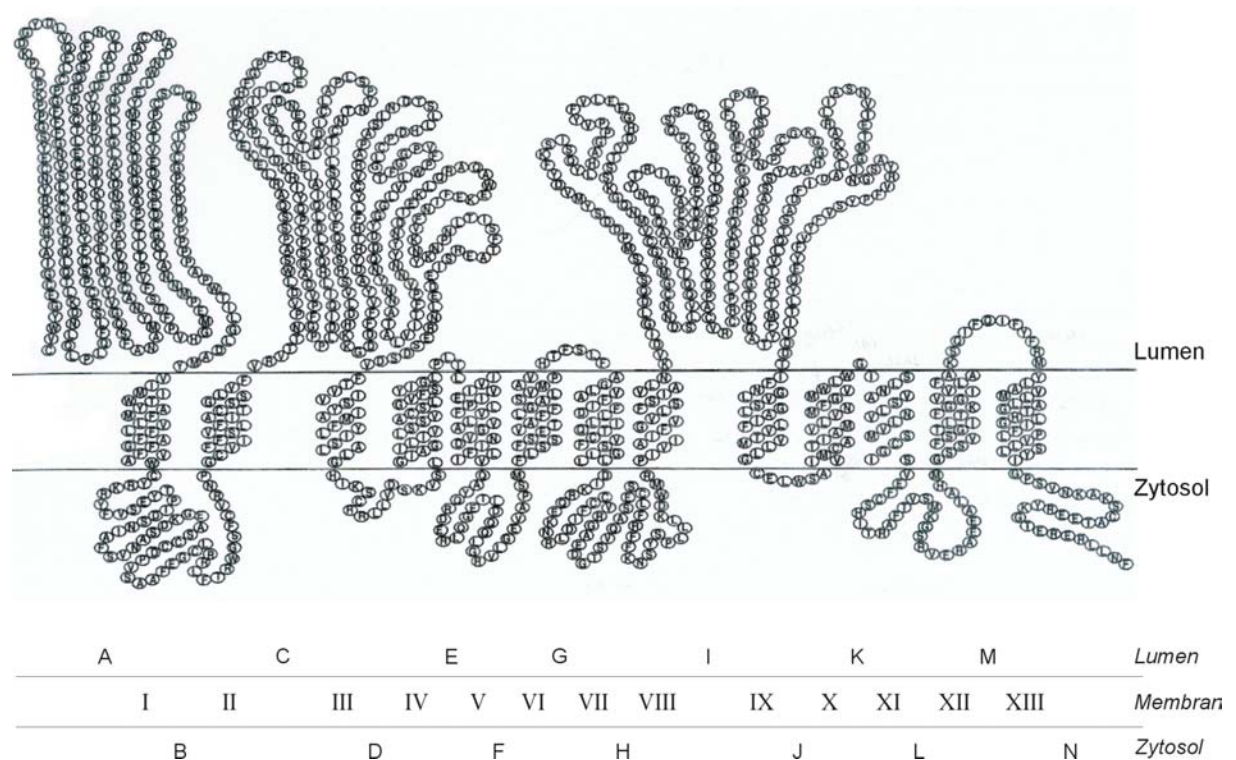


Abb. 5.5: **Modell der Topologie des NPC-1 Proteins.** Die SSD umspannt die mit III bis VII bezifferten Transmembrandomänen. Von den 14 potentiellen Erkennungssequenzen für N-glykosidische Bindungen liegen fünf in Loop A, ebenso viele in Loop B und drei in Loop C (nach Davies und Ioannou, 2000; Carstea et al., 1997).

Das NPC-1 Protein konnte in der aus der humanen Plazenta isolierten lysosomalen Membran nachgewiesen werden (Abbildung 4.12). Die Immunoaffinitätsreinigung lysosomaler Membranproteine mit Hilfe eines gegen LAMP-2 gerichteten Antikörpers führte zur Anreicherung des NPC-1 Proteins (Abbildung 4.13), diese ging mit einer Anreicherung der sau-

ren β -Glucosidase einher. Das im Western-Blot nachgewiesene Membranprotein hat ein apparentes Molekulargewicht von 204 und 173 kDa. Das stärkere Signal ist generell bei 173 kDa zu detektieren. Die Behandlung des Proteins mit der Peptid N-Glycosidase F führte zu einer Reduktion des apparenten Molekulargewichts auf 151 kDa. Die Banden bei 204 und 173 kDa sind nicht mehr detektierbar (Abbildung 4.22). Es folgt daraus, dass sich die beiden Banden des NPC-1 Proteins nur durch ihre N-gebundenen Oligosaccharidseitenketten unterscheiden.

Zellbiologische Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass das NPC-1 Protein in LAMP-1 (Higgins et al., 1999) beziehungsweise in LAMP-2 (Neufeld et al., 1999; Patel et al., 1999) positiven Vesikeln beziehungsweise Organellen lokalisiert ist. Hierbei handelt es sich vermutlich um Endosomen und Lysosomen (Watari et al., 1999a). Eine Anreicherung endozytierten LDL-Cholesterols konnte in LAMP-2 positiven und NPC-1 Protein negativen, nicht jedoch in LAMP-2 und NPC-1 Protein positiven Vesikeln detektiert werden (Neufeld et al., 1999). Weiterführende Studien haben gezeigt, dass das NPC-1 Protein primär in den späten Endosomen und sekundär in den Lysosomen und dem Trans-Golgi-Netzwerk vorkommt (Higgins et al., 1999).

Neben dem NPC-1 Protein sind noch weitere lysosomale Membranproteine bekannt, die sowohl im endosomalen als auch im lysosomalen Kompartiment vorkommen. Es handelt sich um Endolyn-78 und CD63 (Ihrke et al., 2000; Metzelaar et al., 1991; Croze et al., 1989).

Es wird beschrieben, dass es im Verlauf der Reifung der Lysosomen zu einer Zunahme der Dichte des Organells kommt (Pertoft et al., 1978). Es werden die späten, schweren, dichten Lysosomen (Dense Lysosomes) von den frühen, leichten Lysosomen geringerer Dichte (Low Buoyancy Lysosomes) unterschieden (Rome et al., 1979).

Die Charakterisierung des zur Isolierung von Lysosomen verwendeten Percoll®-Gradienten hat gezeigt, dass alle untersuchten lysosomalen Proteine, Membran- und Matrixproteine, eine zweigipfelige Verteilung aufweisen (Abbildung 5.6). In den Fraktionen mit größerer Dichte ist das jeweils stärkste Signal beziehungsweise die höchste Enzymaktivität aller Proteine in einer Fraktion (Fraktion 4) zu detektieren. Dies gilt sowohl für die lysosomalen Membranproteine NPC-1, LAMP-2, die saure β -Glucosidase als auch für die *N*-Acetyltransferase und – als Vertreter der löslichen Proteine – für das Kathepsin D. Diese Übereinstimmung ist ein Hinweis darauf, dass es sich um ein Kompartiment handelt, das so genannte lysosomale Kompartiment. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten ferner darauf hin, dass die löslichen Markerproteine der lysosomalen Organellen (Kathepsin D und β -

Hexosaminidase) in den dichten Lysosomen im Vergleich stärker angereichert sind, als die Membranproteine LAMP-2 und NPC-1 und in geringerem Maße auch die saure β -Glucosidase.

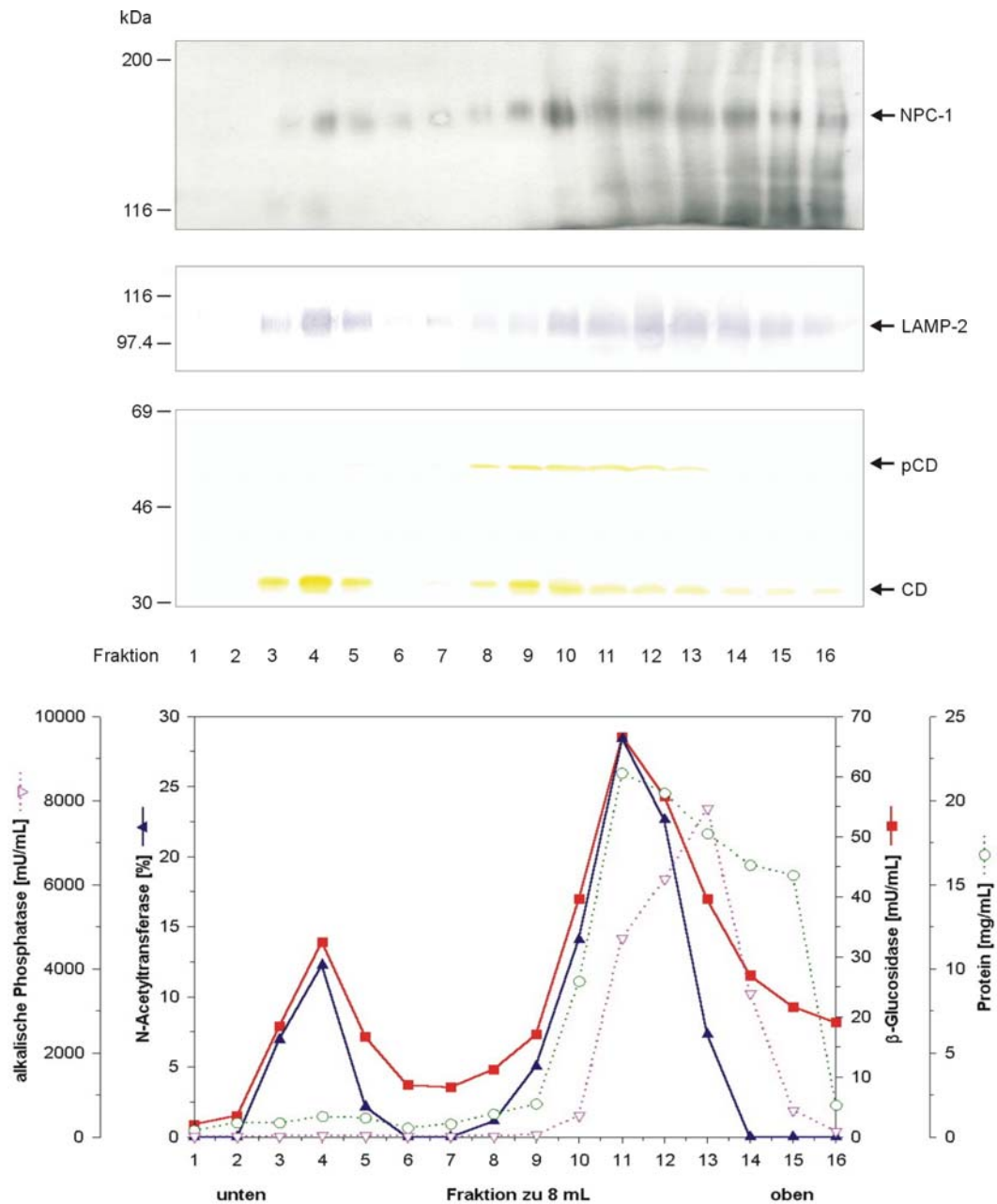


Abb. 5.6: **Zusammenfassende Charakterisierung des Percoll®-Gradienten.** Das NPC-1 Protein, LAMP-2 und Kathepsin D (pCD, CD) werden im Western-Blot dargestellt. Die Enzymaktivität der N-Acetyltransferase (ausgefüllt nach oben zeigende Dreiecke), der sauren β -Glucosidase (ausgefüllte Quadrate) und der alkalischen Phosphatase (leere nach unten zeigende Dreiecke) sowie die Proteinkonzentration (leere Kreise) der einzelnen Fraktionen werden graphisch dargestellt. (Originalabbildungen: 4.14 bis 4.17). Die dazugehörige Aktivität der β -Hexosaminidase ist im Ergebnisteil in Abbildung 4.14 dargestellt.

In den aus der humanen Plazenta isolierten Lysosomen besteht folgerichtig eine gemeinsame Lokalisation des Niemann-Pick Typ C-1 Protein mit LAMP-2, der *N*-Acetyltransferase, der sauren β -Glucosidase und dem Kathepsin D.

In den Fraktionen geringerer Dichte ist ebenfalls eine gemeinsame Lokalisation der untersuchten Proteine zu detektieren. Unterschiede sind allerdings in den jeweiligen Fraktionen mit dem deutlichsten Signal beziehungsweise der höchsten Enzymaktivität zu erkennen.

Nach Gieselmann et al. (1983) liegt der Ort der Reifung des Kathepsin D im lysosomal-endosomal Kompartiment. Fraktionen, in denen sowohl deutliche Signale des Prokathepsin D als auch des Kathepsin D zu detektieren sind, werden somit dem lysosomal-endosomal Kompartiment zugeordnet. In Bereichen unterschiedlicher Dichte dieses Kompartiments sind auch die deutlichsten Signale des NPC-1 Proteins (Fraktion 10), der *N*-Acetyltransferase und der sauren β -Glucosidase (Fraktion 11) sowie von LAMP-2 (Fraktion 12) zu erkennen. Daraus wird geschlossen, dass das NPC-1 Protein und LAMP-2 in den Fraktionen geringerer Dichte auch in verschiedenen Organellen auftritt. Es kann weiterhin festgehalten werden, dass das Verhältnis dieser beiden Membranproteine zueinander von Kompartiment zu Kompartiment unterschiedlich ist.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Higgins et al. (1999) konnte gezeigt werden, dass das NPC-1 Protein primär im endosomal-lysosomal Kompartiment und sekundär in den Lysosomen vorkommt (Abbildung 4.17 und 4.18).

Zwischen den beiden Gipfeln des charakterisierten Percoll[®]-Gradienten liegt ein Bereich (Fraktion 6 und 7), in dem das NPC-1 Protein deutlich und LAMP-2 nur schwach bis gar nicht zu detektieren ist. Letzteres trifft auch für Kathepsin D zu. Blanchette-Mackie (2000) hat beschrieben, dass in späten Endosomen das NPC-1 Protein, nicht aber Kathepsin D nachgewiesen werden konnte. Aufgrund des schwachen LAMP-2 und des fehlenden Kathepsin D Signals wird vermutet, dass es sich hierbei nicht um einen Übergang der leichten zu den schweren Lysosomen handeln kann, sondern um ein NPC-1 reiches Kompartiment, welches am Cholesteroltransport beteiligt ist (Higgins et al., 1999; Neufeld et al., 1999), oder um späte Endosomen.

5.2.4 Zusammensetzung schwerer und leichter lysosomaler Membranen, ein Vergleich

Die dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass sich als schwere (Fraktion 2 bis 5) und leichte lysosomale Membranen (Fraktion 7 bis 9) bezeichnete Fraktionen sowohl in ihrem Lipid- als auch in ihrem Proteinmuster unterscheiden (siehe Kapitel 4.4). Bedingt dadurch,

dass die prozentuale Verteilung der Lipide im jeweiligen Ausgangsmaterial (dichter beziehungsweise weniger dichter Pool) und den entsprechenden hochreinen Immunoaffinitätsmembranen gleich ist, wird davon ausgegangen, dass die Proben kaum durch fremde Organellen ähnlicher Dichte kontaminiert sind, und die Ergebnisse die Verteilung der lysosomalen Membranlipide beider Pools, nach dem jetzigen Stand der Kenntnisse, abbilden.

Der Cholesterolgehalt in Membranen korreliert positiv mit dem des Sphingomyelins (Übersicht: Liscum et al., 1999). Diese Beobachtung kann auch für die schweren und leichten lysosomalen Membranen bestätigt werden (Tabelle 4.4). Sowohl der Sphingomyelin- als auch der Cholesterolgehalt sind in den schweren lysosomalen Membranen höher als in den leichten.

Tab. 5.1: Vergleichende Darstellung der Lipidzusammensetzung von Lysosomen.

Subzelluläre Fraktion	prozentuale Verteilung der Phospholipide								Chol/PL [mol/mol]	Autor
	SM	PC	PE	PS	PI	CL	LyPL	sonstige		
Lysosomen aus Rattenleber	7.6 (8.6)*	41.4 (47)*	26.3 (30)*	3 (3.4)*	9.7 (11)*	4 -	3.8 -	4.2 -	0.27 -	Henning und Heidrich 1974
Lysosomen aus Rattenleber	9.1 (10.5)*	45.7 (52.8)*	18.8 (21.7)*	3.4 (3.9)*	9.5 (11)*	2.6 -	1.9 -	4.5 -	-	Hostettler et al. 1985
Lysosomale Membran aus L-Zellen	-	-	-	-	-	-	-	-	0.38	Schoer et al. 2000
DP-Lysosomen aus humaner Plazenta										
dichter Pool	11.9	50.6	25.8	0.0	11.7	-	-	-	0.44	eigene Daten
UZ-Membranen	10.6	43.4	31.8	4.3	9.9	-	-	-	0.49	eigene Daten
Affi-Membranen	20.5	43.7	26.6	5.7	3.5	-	-	-	0.33	eigene Daten
WDP-Lysosomen aus humaner Plazenta										
weniger dichter Pool	6.8	56.6	29.3	0.0	7.3	-	-	-	0.26	eigene Daten
UZ-Membranen	6.8	55.0	31.4	0.0	6.8	-	-	-	0.17	eigene Daten
Affi-Membranen	8.3	53.1	27.9	2.4	8.3	-	-	-	0.25	eigene Daten

SM: Sphingomyelin; PC: Phosphatidylcholin; PE: Phosphatidylethanolamin; PS: Phosphatidylserin; CL: Cardiolipin (Diphosphatidylglycerol);
LyPL: Summe der Lyso-phospholipide; Chol: Cholesterol; PL: Phospholipide; DP: dichter Pool; WDP: weniger dichter Pool;
UZ: ultrazentrifugiert; Affi: immunoaffinitätsgereinigt;

* Zur besseren Vergleichbarkeit mit eigenen Daten: Berechnete prozentuale Verteilung der Phospholipide ohne CL, LyPL und sonstige.
Summe aus SM, PC, PE PS und PI entsprechen hier 100%.

Die Lipidzusammensetzung einer Membran muss die passende Umgebung für die Funktion der Membran, die membrangebundenen Transporter, Ionenkanäle und Enzyme des Stoffwechsels bilden (Bastiaanse et al., 1997). Mit steigendem Cholesterolgehalt sinkt die Fluidität der Membran (Übersicht: Bastiaanse et al., 1997). Des Weiteren hemmt ein Cholesterolanstieg der Membran ATP-abhängige Kationentransporter und aktiviert die meisten anderen Transportproteine (Bastiaanse et al., 1997). Im Verlauf der Reifung der Lysosomen

wird ein Anstieg des Cholesterolgehalts beobachtet. Dies könnte zur Aktivierung der – nach wie vor proteinbiochemisch wenig bekannten – lysosomalen Transportproteine führen.

Trotz des – im Verlauf der „Reifung“ von Lysosomen – zu beobachtenden Cholesterolanstiegs bilden die Phospholipide den Hauptanteil der lysosomalen Membranlipide (Abbildung 4.23). Dies wird übereinstimmend auch von anderen Autoren beschrieben (Tabelle 5.1).

Anhand der vorliegenden Daten ergibt sich für die Lipidzusammensetzung der schweren lysosomalen Membran folgendes Bild: (1) Phosphatidylcholin ist das am stärksten vertretene Phospholipid (43.7 bis 52.8* %), gefolgt von Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol beziehungsweise Sphingomyelin und Phosphatidylserin. (2) Das Verhältnis des Cholesterols zu den Phospholipiden [mol/mol] liegt zwischen 0.27 bis 0.49. Hiermit liegt es zwischen dem der Plasmamembran mit 0.6 (Warnock et al., 1993; Duranthon et al., 1991) und dem des endoplasmatischen Retikulums mit 0.08 (van Meer, 1998).

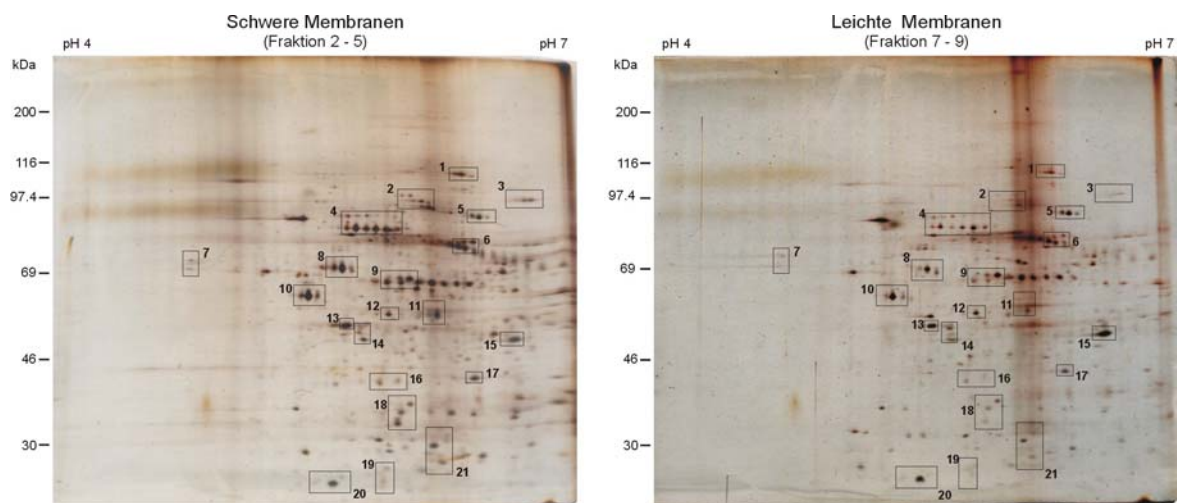


Abb. 5.7: **Zweidimensionale, silbergefärbte Darstellung immunoaffinitätsgeinigter schwerer und leichter lysosomaler Membranproteine.** Durch Zahlen von 1 bis 21 werden einige der Proteine beziehungsweise Proteingruppen hervorgehoben, die in beiden SDS-Polyacrylamidgelen zu detektieren sind (Teil der Originalabbildung: 4.24).

Der Vergleich der schweren und leichten Lysosomen bezogen auf die Verteilung des Niemann-Pick Typ C-1 Proteins (Abbildung 4.17 und 4.18) und des Cholesterolgehalts (siehe Tabelle 4.4) zeigt, dass die leichten Lysosomen im Verhältnis einen höheren Anteil des NPC-1 Proteins und einen geringeren Anteil des Cholesterols aufweisen. Da das NPC-1 Protein am Transport des Cholesterols aus dem lysosomalen System zur Plasmamembran und dem endoplasmatischen Retikulum beteiligt ist (Sokol et al., 1988), weist der beschriebene Unterschied darauf hin, dass in den schweren Lysosomen aufgrund eines geringeren

Exports des Cholesterols – auch unter physiologischen Bedingungen – eine Anreicherung dieses Lipids stattfinden könnte.

Das Proteinmuster der immunoaffinitätsgereinigten leichten und schweren Membranen angereichert aus leichten und schweren lysosomalen Fraktionen eines Percoll®-Gradienten unterscheiden sich nur in geringem Maße (Abbildung 5.7). Aufgrund der Dichteunterschiede der Fraktionen ist zu vermuten, dass in den leichten Membranen die frühen lysosomalen Kompartimente, Endosomen und die multivesikulären Bodies und in den schweren Membranen die „reifen“ lysosomalen Organellen angereichert sind (Pertoft et al., 1978).

Dies führt zu der Vermutung, dass es sich bei den zweidimensional dargestellten Membranproteinen, die sowohl in den schweren als auch in den leichten Membranen zu detektieren sind, um lysosomale Membranproteine handelt. In besonderem Maße zählen die Proteine und Proteingruppen dazu, die in den schweren Membranen – dem dichten Pool – als Glykoproteine identifiziert wurden: sowohl jene, die durch die Peptid N-Glycosidase F- und/oder Neuraminidase-Behandlung „verschwunden“ sind (Abbildung 4.8 bis 4.10 jeweils A) als auch jene, die im Anschluss an die Deglykosylierung neu detektiert werden konnten (Abbildung 4.8 bis 4.10 jeweils B).

Eine Möglichkeit zur Bestätigung dieser Hypothese liegt in der massenspektrometrischen Untersuchung oder der Sequenzanalyse der identifizierten lysosomalen Membranproteine.

6 Zusammenfassung

Von den Proteinen der lysosomalen Membran sind bisher nur wenige bekannt. Dies steht in einem gewissen Gegensatz zu den vielfältigen spezifischen Transportaufgaben der lysosomalen Membran. Ein genetischer Defekt eines für die Aufrechterhaltung des lysosomalen Systems verantwortlichen Proteins führt zur Ausbildung einer lysosomalen Speicherkrankheit. Ein Beispiel hierfür ist die Niemann-Pick Typ C-1 Krankheit.

Bei allen bisher identifizierten lysosomalen Membranproteinen handelt es sich um Glykoproteine. Bisher wurden gezielt nur einzelne Proteine untersucht, nie aber das Proteom der lysosomalen Membranproteine zweidimensional aufgetrennt und charakterisiert.

1) In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass zur Trennung eines Gemisches lysosomaler Membranproteine die isoelektrische Fokussierung in Röhrchengelen mit Trägerampholyten eine deutlich bessere Ausbeute und Auftrennung lysosomaler Membranproteine erzielt werden kann, als bei der Verwendung immobilisierter pH-Gradienten. Besonders deutlich ist dies bei Proteinen mit einem Molekulargewicht höher als 30 kDa und einem isoelektrischen Punkt größer als pH 6.0. Mit Hilfe der vorliegenden, etablierten Methode ist es möglich, bis zu 500 µg lysosomalen Membranproteins zu lysieren und in einem Bereich von pH 4.0 bis 7.0 zweidimensional aufzutrennen. Die reifen lysosomalen Membranproteine weisen ein Molekulargewicht von etwa 10 kDa bis über 200 kDa auf.

2) Eine Natriumcarbonat-Behandlung der lysosomalen Membranproteine zeigte, dass über 90 % der Proteine im Niederschlag zu finden sind. Hierzu zählen die Acetyl-Coenzym A: α -Glucosaminid N-Acetyltransferase (EC 2.3.1.78) und LAMP-2. Einige Membranproteine konnten sowohl im Niederschlag als auch im Überstand detektiert werden. Es handelt sich hierbei um periphere Membranproteine.

3) Es konnte gezeigt werden, dass weniger als ein Viertel der immunoaffinitätsgereinigten lysosomalen Membranproteine glykosyliert sind. Hiervon tragen über 80 % Neuraminsäuren und schätzungsweise 40 % N-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharidseitenketten. Über 35 % der detektierten glykosylierten lysosomalen Membranproteine tragen sowohl N-Glykane als auch Neuraminsäuren.

4) Das im Western-Blot nachgewiesene lysosomal assoziierte Membranprotein-2 (LAMP-2) ist im Anschluss an die Natriumcarbonat-Behandlung im Niederschlag zu detektieren, trägt sowohl N-Glykane als auch Neuraminsäuren, weist ein apparentes Molekulargewicht von 100 bis 110 kDa auf und hat einen isoelektrischen Punkt von pH 4.2 bis 4.7.

5) In der aus humaner Plazenta isolierten lysosomalen Membran konnte das so genannte Niemann-Pick Typ C-1 Protein (NPC-1) mittels Western-Blotting nachgewiesen werden. Das reife Protein kommt in zwei Formen vor und hat ein Molekulargewicht von 204 beziehungsweise 173 kDa. Die Behandlung mit Peptid N-Glycosidase F führt zu einer Reduktion des Molekulargewichts beider Formen auf 151 kDa.

Untersuchungen zum Vorkommen des NPC-1 im Verlauf des Percoll®-Gradienten zeigten, dass dieses Membranprotein nicht nur in den schweren Fraktionen des lysosomalen Kompartiments, sondern auch in leichteren Fraktionen des Gradienten, dem so genannten endosomal/lysosomalen Kompartiment detektiert werden konnte. Der Vergleich mit der entsprechenden Verteilung des LAMP-2 zeigt, dass es in den schweren Fraktionen parallel mit dem NPC-1 verläuft. Im Bereich der leichten Fraktionen ist dieses Verhältnis jedoch nicht konstant. Im mittleren Teil des Gradienten ist das NPC-1 relativ stärker vertreten als das LAMP-2. Im oberen Teil des Gradienten zeigt sich ein genau umgekehrtes Verhältnis von NPC-1 zu LAMP-2.

6) Die schweren lysosomalen Membranen weisen im Vergleich zu den leichten lysosomalen Membranen einen relativ höheren Cholesterol- und Sphingomyelingehalt auf. Die Phospholipide bilden die stärkste Lipidgruppe der Lysosomen. Hiervon ist der häufigste Vertreter das Phosphatidylcholin. Bezogen auf das jeweilige Ausgangsmaterial liegt das Verhältnis des Cholesterols zu den Phospholipiden der leichten Fraktionen bei 0.26 und der schweren Fraktionen bei 0.44.

Die zweidimensionale Auftrennung immunoaffinitätsgereinigter Membranen der schweren und leichten Fraktionen des Percoll®-Gradienten zeigt eine sehr große Übereinstimmung im Muster des jeweiligen Proteoms.

7 Literatur

- Adessi, C., Miege, C., Albrieux, C. and Rabilloud, T. (1997): Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins; a current challenge for immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **18**, 127-135
- Akasaki, K., Kinoshita, H., Fukuzawa, M., Maeda, M., Yamaguchi, Y., Furuno, K. and Tsuji, H. (1992): Isolation and characterization of a novel membrane glycoprotein of 85000 molecular weight from rat liver lysosomes. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 170-173
- Andersson, H.C., Kohn, L.D., Bernardi, I., Blom, H.J., Tietze, F. and Gahl, W.A. (1990): Characterization of lysosomal moniodotyrosine transport in rat thyroid cells. Evidence for transport by system h. *J. Biol. Chem.* **265**, 10950-10954
- Andrejewski, N., Punnonen, E.-L., Guhde, G., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., Figura, K. von and Saftig, P. (1999): Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **274**, 12692-12701
- Arai, K., Shimaya, A., Hiratani, N. and Okuma, S. (1993): Purification and characterization of lysosomal H⁺-ATPase. An anion-sensitive v-type H⁺-ATPase from rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* **268**, 5649-5660
- Aula, N., Salomäki, P., Timonen, R., Verheijen, F., Mancini, G., Mansson, J.-E., Aula, P. and Peltonen, L. (2000): The spectrum of SLC17A5-gene mutations resulting in free sialic acid-storage diseases indicates some genotype-phenotype correlation. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 832-840
- Aula, P., Autio, S., Raivio, K.O., Thoden, C.J., Koskela, S.L. and Yamashina, I. (1979): "Salla disease": a new lysosomal storage disorder. *Arch. Neurol.* **36**, 88-94
- Bainton, D.F. (1981): The discovery of lysosomes. *J. Cell Biol.* **91**, 66s-76s
- Bame, K.J. and Rome, L.H. (1986): Acetyl-coenzyme A:α-glucosaminide N-acetyl-transferase. *J. Biol. Chem.* **261**, 10127-10132
- Barrett, A.J. (1977): Cathepsin D and other carboxyl proteinases, in proteinases in mammalian cells and tissues, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, 209-248
- Barrett, A.J. (1979): Cathepsin D: the lysosomal aspartic proteinase, Ciba Found Symp. **75**, 37-50
- Barriocanal, J.G., Bonifacio, J.S., Yuan, L. and Sandoval, I.V. (1986): Biosynthesis, glycosylation, movement through the golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **261**, 16755-16763
- Bastiaanse, E.M.L., Höld, K.M. and Laarse, A. van der (1997): The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovasc. Res.* **33**, 272-283
- Baum, M. (1998): The Fanconi syndrome of cystinosis: insight into the pathophysiology. *Pediatr. Nephrol.* **12**, 492-497

- Berkelman, T. and Stenstedt, T. (1998) in *2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients, Principles & Methods*. Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden
- Bernar, J., Tietze, F., Kohn, L.D., Bernardini, I., Harper, G.S., Grollmann, E.F. and Gahl, W.A. (1986): Characterization of a lysosomal membrane transport system for tyrosine and other neutral amino acids in rat thyroid cells. *J. Biol. Chem.* **261**, 17107-17112
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R. and Postel, W. (1982): Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principles, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* **6**, 317-339
- Blanchette-Mackie, E.J. (2000): Intracellular cholesterol trafficking: role of the NPC1 protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 171-183
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Braun, M., Waheed, A. and Figura, K. von (1989): Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via cell surface. *EMBO J.* **8**, 3633-3640
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1986): A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47
- Burkhardt, J., Huber, L.A., Dieplinger, H., Blocker, A., Griffiths, G. and Desjadins, M. (1995): Gaining insight into a complex organelle, the phagosome, using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **16**, 2249-2257
- Butler, J.D., Blanchette-Mackie, J., Goldin, E., O'Neil, R.R., Carstea, G., Roff, C.F., Patterson, M.C., Patel, S., Comly, M.E., Cooney, A., Vanier, M.T., Brady, R.O. and Pentchev, P.G. (1992): Progesterone blocks cholesterol translocation from lysosomes. *J. Biol. Chem.* **267**, 23797-23805
- Carlsson, S. R., Roth, J., Piller, F. and Fukuda, M. (1988): Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylactosaminoglycan. *J. Biol. Chem.* **263**, 18911-18919
- Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B., Nagle, J., Polymeropoulos, M.H., Sturley, S.L., Ioannou, Y.A., Higgins, M.E., Comly, M., Cooney, A., Brown, A., Kanetski, C.R., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Neufeld, E.B., Chang, T-Y., Liscum, L., Strauss III, J.F., Ohno, K., Zeigler, M., Carmi, R., Sokol, J. Markie, D., O'Neil, R.R., Diggelen van, O.P., Elleder, M., Patterson, M.C., Brady, R.O., Vanier, M.T., Pentchev, P.G. and Tagle, D.A. (1997): Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* **227**, 228-231
- Cha, Y., Holland, S.M. and August, J.T. (1990): The cDNA sequence of mouse LAMP-2. *J. Biol. Chem.* **265**, 5008-5013
- Chataway, T.K., Whittle, A.M., Lewis, M.D., Bindloss, C.A., Davey, R.C.A., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Hopwood, J.J. and Meikle, P.J. (1998): Two-dimensional mapping and microsequencing of lysosomal proteins from human placenta. *Placenta* **19**, 643-654

- Chen, J.W., Cha, Y., Yuksel, K.U., Gracy, R.W. and August, J.T. (1988): Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding lysosomal membrane glycoprotein mouse LAMP-1. *J. Biol. Chem.* **263**, 8754-8758
- Chen, J.W., Murphy, T.L., Willingham, M.C., Pastan, I. and August, J.T. (1985): Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J. Cell Biol.* **101**, 85-95
- Cherqui, S., Kalatzis, V., Trugnan, G. and Antignac, C. (2001): The targeting of cystinosin to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif. *J. Biol. Chem.* **276**, 13314-13321
- Chevalet, M., Santoni, V., Poinas, A., Rouquié, D., Fuchs, A., Kieffer, S., Rossignol, M., Lunardi, J., Garin, J. and Rabilloud, T. (1998): New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 1901-1909
- Chiang, H.-L. and Dice, J.F. (1988): Peptide sequences that target proteins for enhances degradation during serum withdrawal. *J. Biol. Chem.* **263**, 6797-6805
- Chou, K-C. and Elrod, D.W. (1999): Prediction of membrane protein types and subcellular locations. *Proteins* **34**, 137-153
- Clarke, L.A. (1997) in *Organelle Diseases: Clinical features, diagnosis, pathogenesis and management* (Applegarth, D.A., Dimmick, J.E. and Hall, J.G., Herausgeber), CHAPMAN & HALL MEDICAL, 64
- Croze, E., Ivanov, I.E., Kreibich, G., Adesnik, M., Sabatini, D.D. and Rosenfeld, M.G. (1989): Endolyn-78, a membrane glycoprotein present in morphologically diverse components of the endosomal and lysosomal compartments: implications for lysosome biogenesis. *J. Cell Biol.* **108**, 1597-1613
- Cruz, J.C., Sugii, S., Yu, C. and Chang, T.-Y. (2000): Role of Niemann-Pick Type C1 protein in intracellular trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *J. Biol. Chem.* **275**, 4013-4012
- Cuervo, A.M. and Dice, J.F. (1996): A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* **273**, 501-503
- Cuervo, A.M. and Dice, J.F. (1998): Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J. Mol. Med.* **76**, 6-12
- Cuervo, A.M., Dice, J.F. and Knecht, E. (1997): A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 5606-5615
- Cuervo, A.M., Terlecky, S.R., Dice, J.F. and Knecht, E. (1994): Selective binding and uptake of ribonuclease A and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by isolated rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* **269**, 26374-26380
- Danon, M.J., Oh, S.J., DiMauro, S., Manaligod, J.R., Eastwood, A., Naidu, S. and Schliselfeld, L.H. (1981): Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology* **31**, 51-57

- Davies, J.P. and Ioannou, Y.A. (2000): Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activation protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 24367-24374
- Diettrich, O. (1996): Reinigung lysosomaler Membranproteine und Untersuchung eines Sialinsäure-bindenden Protein. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn
- Diettrich, O., Gallert, F. and Hasilik, A. (1996): Purification of lysosomal membrane proteins from human placenta. *Eur. J. Cell Biol.* **69**, 99-106
- Dongen, J.M. van, Willemsen, R., Ginns, E., Sips, H.J., Tager, J.M., Barranger, J.A. and Reuser, A.J.J. (1985): The subcellular localization of soluble and membrane-bound lysosomal enzymes in I-cell fibroblasts: a comparative immunocytochemical study. *Eur. J. Cell Biol.* **39**, 179-189
- Duranthon, V., Fremot, L. and Leger, C.L. (1991): Effect of essential fatty acid deficiency on lipid composition of basolateral plasma membrane of pig intestinal mucosa cells. *Lipids* **26**, 175-181
- Duve, C. de (1983) : Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* **137**, 391-375
- Duve, C. de, Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans F. (1955): Tissue fractionation studies. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.* **60**, 604-617
- Fairbanks, G., Steck, T.L. and Wallach, D.F.H. (1971): Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617
- Fambrough, D.M., Takeyasu, K., Lippincott-Schwarz, J. and Siegel, N.R. (1988): Structure of LEP100, a glycoprotein that shuttles between lysosomes and the plasma membrane, deduces from the nucleotide sequence of the encoding cDNA. *J. Cell. Biol.* **106**, 61-67
- Figura, K. von (1977): Human α -N-acetylglucosaminidase. 1. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* **80**, 525-533
- Forster, S. and Lloyd, J.B. (1988): Solute translocation across the mammalian lysosomal membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **947**, 465-491
- Fujiki, Y., Fowler, S., Shio, H., Hubbard, A.L. and Lazarow, P.B. (1982b): Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: Comparison with endoplasmatic reticulum and mitochondrial membranes. *J. Cell Biol.* **93**, 103-110
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. and Lazarow, P.B. (1982a): Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmatic reticulum. *J. Cell Biol.* **93**, 97-102
- Fujita, H., Ezaki, J., Noguchi, Y., Kono, A., Himeno and M., Kato, K. (1991): Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 85kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 444-452

- Fujita, H., Saeki, M., Yasunaga, K., Ueda, T., Imoto, T. and Masaru, M. (1999): In vitro binding of adapter protein complex (AP-1) to lysosomal targeting motif (LI-motif). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 54-58
- Fujita, H., Takata, Y., Kono, A., Tanaka, Y., Takahashi, T., Himeno, M. and Kato, K. (1992): Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding the 85 kDa human lysosomal sialoglycoprotein (hLGP85) in human metastatic pancreas islet tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 604-611
- Fukuda, M. (1991): Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* **266**, 213270-21330
- Fukuda, M., Viitala, J., Matteson, J. and Carlsson, S.R. (1988): Cloning of cDNAs encoding human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. *J. Biol. Chem.* **263**, 18920-18928
- Gahl, W.A. (1989): Lysosomal membrane transport in cellular nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **9**, 39-61
- Gatt, S. (1969): β -Glucosidase from bovine brain. *Methods in Enzymology* **14**, 152-155
- Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A. and Figura, K. von (1983): Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultures human fibroblasts. *J. Cell. Biol.* **97**, 1-5
- Golabek, A.A., Kaczmarek, W., Kida, E., Kaczmarek, A., Michalewski, M.P. and Wisniewski, K.E. (1999): Expression studies of CLN3 protein (battenin) in fusion with the green fluorescent protein in mammalian cells in vitro. *Mol. Genet. Metab.* **66**, 277-282
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Csordas, A., Diaz, J.-J. and Madjar, J.-J. (1997): Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis* **18**, 328-337
- Görg, A., Postel, W., and Gunther, S. (1988): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9**, 531-546
- Gottschalk, S., Waheed, A., Schmidt, B., Laidler, P. and Figura, K. von (1989): Sequential processing of lysosomal acid phosphatase by a cytoplasmic thiol proteinase and a lysosomal aspartyl proteinase. *EMBO J.* **8**, 3215-3219
- Gradilone, S.A., Arranz, S.E. and Cabala, M.O. (1998): Detection of highly glycosylated proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **261**, 224-227
- Granger, B.L., Green, S.A., Gabel, C.A., Howe, C.L., Mellman, I. and Helenius, A. (1990): Characterization and cloning of lgp110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 12036-12043
- Grässel, S., Röling, A. and Hasilik, A. (1989): Immunoprecipitation of labelled antigens with Eupergit C1Z. *Anal. Biochem.* **180**, 72-78
- Greene, A.A., Marcusson, E.G., Morell, G.P. and Schneider, J.A. (1990): Characterization of the lysosomal cystine transport system in mouse L-929 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **265**, 9888-9895
- Hasilik, A. and Neufeld, E.F. (1980): Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **255**, 4937-4945

- Havelaar, A.C., Beerens, C.E.M.T., Mancini, G.M.S. and Verheijen, F.W. (1999): Transport of organic anions by the lysosomal sialic acid transporter: a functional approach towards the gene for sialic acid storage disease. *FEBS Lett.* **446**, 65-68
- Havelaar, A.C., de Gast, I.L., Snijders, S., Beerens, E.M.T., Mancini, G.M.S. and Verheijen, F.W. (1998b): Characterization of a heavy metal ion transporter in the lysosomal membrane. *FEBS Lett.* **436**, 223-227
- Havelaar, A.C., Mancini, G.M.S., Beerens, C.E.M.T., Souren, R.M.A. and Verheijen, F.W. (1998a): Purification of the lysosomal sialic acid transporter. *J. Biol. Chem.* **273**, 34568-34574
- Henning, R. and Heidrich, H-G. (1974): Membrane lipids of rat liver lysosomes prepared by freeflow electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **345**, 326-335
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1986): Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Silberfärbung. Elektrophoreseforum '86 – München 6. Diskussionstagung –, 27–29
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1988): Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem development unit. I Staining of sodium dodecylsulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32
- Higgins, M.E., Davies, J.P., Chen, F.W. and Ioannou, Y.A. (1999): Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-golgi network. *Mol. Gen. Metab.* **68**, 1-3
- Himeno, M., Noguchi, Y., Sasaki, H., Tanaka, Y., Furono, K., Kono, A., Sakaki, Y. and Kato, K. (1989): Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 107 kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *FEBS Lett.* **244**, 351-356
- Hirano, H., Kawasaki, H. and Sassa, H. (2000): Two-dimensional gel electrophoresis using immobilized pH gradient tube gels. *Electrophoresis* **21**, 440-445
- Holtzhauer, M. (1995) in *Biochemische Labormethoden*, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 224-225
- Höning, S., Griffith, J., Geuze, H.J. and Hunziker, W. (1996): The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into golgi-derived clathrin-coated vesicles. *EMBO J.* **15**, 5230-5239
- Höning, S., Sandoval, I.V. and Figura, K. von (1998): A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J.* **17**, 1304-1314
- Hopwood, J.J. and Brooks, D.A. (1997) in *Organelle Diseases: Clinical features, diagnosis, pathogenesis and management* (Applegarth, D.A., Dimmick, J.E. and Hall, J.G., Herausgeber), CHAPMAN & HALL MEDICAL, 7-36
- Hostettler, K.Y., Reasor, M. and Yazaki, P.J. (1985): Chloroquine-induces phospholipid fatty liver. *J. Biol. Chem.* **260**, 215-219
- Hotta, H., Ross, A.H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M.V., Ricciardi, R.P., Tsujimoto, Y., Croce, C.M. and Koprowski, H. (1988): Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res.* **48**, 2955-2962

- Hunziker, W. and Geuze, H.J. (1996): Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *BioEssays* **18**, 379-389
- Idriss, J.M. and Jonas, A.J. (1991): Vitamins B₁₂ transport by rat liver lysosomal membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **266**, 9438-9441
- Ihrke, G., Gray, S.R. and Luzio, J.P. (2000): Endolyn is a mucin-like type I membrane protein targeted to lysosomes by its cytosolic tail. *Biochem. J.* **345**, 287-296
- Janes, R.W., Munroe, P.B., Mitchison, H.M., Gardiner, R.M., Mole, S.E. and Wallace, B.A. (1996): A model for Batten disease protein CLN3: functional implications from homology and mutations. *FEBS Lett.* **399**, 75-77
- Järvelä, I., Sainio, M., Rantamäki, T., Olkkonen, V.M., Carpén, O., Peltonen, L. and Jalanko, A. (1998): Biosynthesis and intracellular targeting of the CLN3 protein defective in Batten disease. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 85-90
- Jay, G.D., Culp, D.J. and Jahnke, M. (1990): Silver staining of extensively glycosylated proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels: enhancement by carbohydrate-binding-dyes. *Anal. Biochem.* **185**, 324-330
- Jonas, A.J. and Jobe, H. (1990): *N*-Acetyl-D-glucosamine countertransport in lysosomal membrane vesicles. *Biochem. J.* **268**, 41-45
- Kalatzis, V., Cherqui, S., Antignac, C. and Gasnier, B. (2001): Cystinosis, the protein defective in cystinosis, is a H⁺-driven lysosomal cystine transporter. *EMBO J.* **20**, 5940-5949
- Karlsson, K. and Carlsson, S. (1998): Sorting of lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2 into vesicles distinct from mannose 6-phosphate receptor/ γ -adaptin vesicles at the trans-golgi network. *J. Biol. Chem.* **273**, 18966-18973
- Klein, U., Kresse, H. and Figura, K. von (1978): Sanfilippo syndrome type C: deficiency of acetyl-CoA: α -glucosaminide *N*-acetyltransferase in skin fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5185-5189
- Kobayashi, T., Beuchat, M.-H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R.D., Sakuraba, H., Parton, R.G. and Gruenberg, J. (1999): Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatic acid regulate cholesterol transport. *Nat. Cell Biol.* **1**, 113-118
- Kornfeld, R. and Kornfeld S.: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 631-664 (1985)
- Kornfeld, S. and Melmann, I. (1989): The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 483-525
- Kundra, R. and Kornfeld, S. (1999): Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J. Biol. Chem.* **274**, 31039-31046
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lange, Y., Ye, J., Rigney, M. and Steck, T. (2000): Cholesterol movement in Niemann-Pick Type C cells and in cells treated with amphiphiles. *J. Biol. Chem.* **275**, 17468-17475
- Le Borgne, R. and Hoflack, B. (1998b): Mechanisms of protein sorting and coat assembly: insights from the clathrin-coated vesicle pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 499-503

- Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U. and Hoflack, B. (1998a): The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 29451-29461
- Letourneur, F. and Klausner, R.D. (1992): A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* **69**, 1143-1157
- Lewis, V., Green, S.A., Marsh, M., Vihko, P., Helenius, A. and Mellman, I. (1985): Glycoproteins of the lysosomal membrane. *J. Cell Biol.* **100**, 1839-1847
- Lippincott-Schwartz, J. and Fambrough, D.M. (1986): Lysosomal membrane dynamics: Structure and interorganellar movement of a major lysosomal membrane glycoprotein. *J. Cell Biol.* **102**, 1593-1605
- Liscum, L. (2000): Niemann-Pick type C mutations cause lipid traffic jam. *Traffic* **1**, 218-225
- Liscum, L. and Faust, J.R. (1987): Low density lipoprotein (LDL)-mediates suppression of cholesterol synthesis and LDL uptake is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **262**, 17002-17008
- Liscum, L. and Munn, N.J. (1999): Intracellular cholesterol transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **1438**, 19-37
- Liscum, L., Ruggiero, R.M. and Faust, J.R. (1989): The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *J. Cell. Biol.* **108**, 1625-1636
- Lottspeich, F. and Zorbas, H. (Herausgeber) (1998) in *Bioanalytik*, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 243-246
- Madden, E.A., Wirt, J.B. and Storrie, B. (1987): Purification and characterization of lysosomes from Chinese hamster ovary cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **257**, 27-38
- Mancini, G.M., Beerens, C.E. and Verheijen, F.W. (1990): Glucose transport in lysosomal membrane vesicles. Kinetic demonstration of a carrier for neutral hexoses. *J. Biol. Chem.* **265**, 12380-12387
- Mancini, G.M.S., Havelaar, A.C. and Verheijen, F.W. (2000): Lysosomale transport disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* **23**, 278-292
- Mane, S.M., Marzella, L.M., Bainton, D.F., Holt, V.K., Cha, Y., Hildreth, J.E.K. and August, J.T. (1989): Purification and characterization of human lysosomal glycoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 360-378
- Meer, G. van (1998): Lipids of golgi membrane. *Trends Cell Biol.* **8**, 29-33
- Meikle, P.J., Whittle, A.M. and Hopwood, J.J. (1995): Human acetyl-coenzyme A: α -glucosaminide N-acetyltransferase. *Biochem. J.* **308**, 327-333
- Metzelaar, M.J., Wijngaard, P.L.J., Peters, P.J., Sixma, J.J., Nieuwenhuis, H.K. and Clevers, H.C. (1991): CD63 Antigen. *J. Biol. Chem.* **266**, 3239-3245
- Millan, J.L. (1986): Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* **261**, 3115-3115
- Mole, S.E. (1999): Batten's disease: eight genes and still counting? *Lancet* **354**, 443-445

Molloy, M.P., Herbert, B.R., Walsh, B.J., Tyler, M.I., Traini, M., Sanchez, J-C., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. and Gooley, A.A. (1998): Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 837-844

Morris, J.A. and Carstea, E.D. (1998): Niemann-Pick C disease: Cholesterol handling gone awry. *Mol. Med. Today* **October**, 525-531

Neufeld, E.D., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A.M., Dwyer, N.K., Roff, C.F., Ohno, K., Morris, J.A., Carstea, E.D., Incardona, J.P., Strauss III, J.F., Vanier, M.T., Patterson, M.C., Brady, R.O., Pentchev, P.G. and Blanchette-Mackie, E.J. (1999): The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J. Biol. Chem.* **274**, 9627-9635

Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T., Mora, M., Riggs, J.E., Oh, S.J., Koga, Y., Sue, C.M., Yamamoto, A., Murakami, N., Shanske, S., Byrne, E., Bonilla, E., Nonaka, I., DiMauro, S. and Hirano, M. (2000): Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* **406**, 906-909

O'Farrell, P.H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021

O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M. and O'Farrell, P.H. (1977): High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**, 1133-1141

Ogata, S. and Fukuda, M. (1994): Lysosomal targeting of LIMP II membrane glycoprotein requires a novel leu-ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* **269**, 5210-5217

Pasquali, C., Fialka, I. and Huber, L.A. (1997): Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis* **18**, 2573-2581

Patel, S.C., Suresh, S., Kumar, U., Hu, C.Y., Cooney, A., Blanchette-Mackie, E.J., Neufeld, E.B., Patel, R.C., Brady, R.O., Patel, Y.C., Pentchev, P.G. and Ong, W.I. (1999): Localization of Niemann-Pick C1 protein in astrocytes: implications for neuronal degeneration in Niemann-Pick type C disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1657-1662

Pentchev, G.P., Brady, R.O., Blanchette-Mackie, E.J., Vanier, M.T., Carstea, E.D., Parker, C.C., Goldin, E. and Roff, C.F. (1994): The Niemann-Pick C lesion and its relationship to the intracellular distribution and utilization of LDL cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* **1225**, 235-243

Pentchev, P.G., Boothe, A.D., Kruth, H.S., Weintraub, H., Stivers, J. and Brady, R.O. (1984): A genetic storage disorder in BALB/C mice with a metabolic block in esterification of exogenous cholesterol. *J. Biol. Chem.* **259**, 5784-5791

Pentchev, P.G., Comly, M.E., Kruth, H.S., Patel, S., Proestel, M. and Weintraub, H. (1986a): The cholesterol storage disorder of the mutant BALB/c mouse *J. Biol. Chem.* **261**, 2772-2777

Pentchev, P.G., Kruth, H.S., Comly, M.E., Butler, J.D., Vanier, M.T., Wenger, D.A. and Patel, S. (1986b): Type C Niemann-Pick disease. *J. Biol. Chem.* **261**, 16775-16780

Pertoft, H., Warmegard, B. and Höök, M. (1978): Heterogeneity of lysosomes originating from rat liver parenchymal cells. *Biochem. J.* **174**, 309-317

- Peters, C. and Figura, K. von (1994): Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS Lett.* **346**, 108-114
- Peters, C., Braun, M., Weber, B., Wendland, M., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A. and Figura, K. von (1990): Targeting of a lysosomal membrane protein: a tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes. *EMBO J.* **9**, 3497-3506
- Pisoni, R. L. and Thoene, J.G. (1989): Detection and characterization of a nucleoside transport system in human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.* **264**, 4850-4856
- Pisoni, R.L., Flickinger, K.S., Thoene, J.G. and Christensen, H.C. (1987): Characterization of carrier-mediated transport systems for small neutral amino acids in human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.* **262**, 6010-6017
- Pisoni, R.R.L. (1991): Characterization of a phosphate transport system in human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.* **266**, 979-985
- Plummer, T.H., Elder, J.H., Alexander, S., Phelan, A.W. and Tarentino, A.L. (1984): Demonstration of peptide: N-glycosidase-F activity in endo- β -N-acetylglucosaminidase F preparations. *J. Biol. Chem.* **259**, 10700-10704
- Pohlmann, R., Krentler, C., Schmidt, B., Schröder, W., Lorkowski, G., Culley, J., Mersmann, G., Geier, C., Waheed, A., Gottschalk, S., Grzeschnik, K-H, Hasilik, A. and Figura, K. von (1988): Human lysosomal acid phosphatase: cloning, expression and chromosomal assignment. *EMBO J.* **7**, 2343-2350
- Rabilloud, T. (1994): Two-dimensional electrophoresis of basic proteins with equilibrium isoelectric focusing in carrier ampholyte-pH gradients. *Electrophoresis* **15**, 278-282
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A. and Lunari, J. (1997): Improvement of the solubilization in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **18**, 307-316
- Rabilloud, T., Blisnick, T., Heller, M., Luche, S., Aebersold, R., Lunardi, J. and Braun-Breton, C. (1999): Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis: comparison of the proteins extracted from normal or *Plasmodium falciparum* – infected erythrocyte ghosts. *Electrophoresis* **20**, 3603-3610
- Radons, J. (1992): Proteintransport in die Lysosomen in U937-Promonozyten. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- Rome, L.H., Garvin, A.J., Allietta, M.M. and Neufeld, E.F. (1979): Two species of lysosomal organelles in cultured human fibroblasts. *Cell* **17**, 143-153
- Rupar, C.A. and Whitehall, J.D. (1988): The preparation of rat liver lysosome membranes. Several membrane proteins contain complex oligosaccharides. *Biochem. Cell Biol.* **66**, 273-278
- Saftig, P. (2001): 13th ESGLD Workshop September 20-23, Woudschoten, Netherlands. Persönliche Mitteilung.

- Saint-Pol, A., Codogno, P. and Moore, S.E. (1999) : Cytosol-to-lysosome transport of free polymannose-type oligosaccharides. Kinetic and specificity studies using rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* **274**, 13547-13555
- Schoer, J.K., Gallegos, A.M., McIntosh, A.L., Starodub, O., Kier, A.B., Billheimer, J.T. and Schroeder, F. (2000): Lysosomal membrane cholesterol dynamics. *Biochemistry* **39**, 7662-7677
- Shih, V.E., Axel, S.M., Tewksbury, J.C., Watkins, D., Cooper, B.A. and Rosenblatt, D.S. (1989): Defective lysosomal release of vitamin B₁₂ (cblF): a hereditary cobalamin metabolic disorder associated with sudden death. *Am. J. Hum. Genet.* **33**, 555-563
- Simões-Barbosa, A., Santana, J. and Teiera, A.R.L. (2000): Solubilization of delipidated macrophage membrane proteins for analysis by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **21**, 641-644
- Simpson, F., Peden, A.A., Christopoulou and Robinson, M.S. (1997): Characterization of the adapter-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol.* **137**, 835-845
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731
- Snyders, L., Umlauf, E. and Prohaska, R. (1999): Association of stomatin with lipid-protein complexes in the plasma membrane and the endocytic compartment. *Eur. J. Cell Biol.* **78**, 802-812
- Sokol, J.M Blanchette-Mackie, E.J., Kruth, H.S., Dwyer, N.K., Amende, L.M., Butler, J.D., Robinson, E., Patel, S., Brady, R.O., Comely, M.E., Vanier, M.T. and Pentchev, P.G. (1988): Type C Niemann-Pick disease: lysosomal accumulation and defective intracellular mobilization of low density lipoprotein cholesterol. *J. Biol. Chem.* **263**, 3411-3417
- Somers, K.L, Brown, D.E., Fulton, R., Schultheiss, P.C., Hamar, D., Smith, M.O., Allison, R., Connally, H.E., Just, C., Mitchell, T.W., Wenger, D.A. and Thrall, M.A. (2001): Effects of dietary cholesterol restriction in a feline model of Niemann-Pick type C disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **24**, 427-436
- Sorge, J., West, C., Westwood, B. and Beutler, E. (1985): Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7289-7293
- Storrie, B. (1988): Assembly of lysosomes: perspectives from comparative molecular cell biology. *Int. Rev. Cytol.* **111**, 53-105
- Tabuchi, M., Yoshimori, T., Yamaguchi, K. Yoshida, T. and Kishi, F. (2000): Human NRAMP2/DMT1, which mediates, iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEP-2 Cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 22220-22228
- Tabuchi, N., Akasaki, K., Sasaki, T., Kanda, N. and Tsuji, H. (1997) : Identification and characterization of a major lysosomal membrane glycoprotein, LGP85/LIMP II in mouse liver. *J. Biochem. (Tokyo)* **122**, 756-763
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.-L., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., Janssen, P.M.L., Blanz, J., Figura, K. von and Saftig, P. (2000): Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* **406**, 902-905
- Terlecky, S.R. and Dice, J.F. (1993): Polypeptide import and degradation by isolated lysosomes. *J. Biol. Chem.* **268**, 23490-23495

Thamotharan, M., Lombardo, Y.B., Bawani, S.Z. and Adibi, S.A. (1997): An active mechanism for completion of the final stage of protein degradation in the liver, lysosomal transport of dipeptides. *J. Biol. Chem.* **272**, 11786-11790

The International Batten Disease Consortium (1995): Isolation of a novel gene underlying Batten disease, CLN3. *Cell* **82**, 949-957

Town, M., Jean, G., Cherqui, S., Attard, M., Forestier, L., Whitmore, S.A., Callen, D.F., Gribouval, O., Broyer, M., Bated, G.P., van't Hoff, W. and Antignac, C. (1998): A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat. Genet.* **18**, 319-324

Uhländer, C. (1997): Kohlenhydrat-unabhängiger Proteintransport in die Lysosomen. Dissertation, Philipps-Universität Marburg

Vanier, M.T. (1983): Biochemical studies in Niemann-Pick disease. *Biochim. Biophys. Acta* **750**, 178-184

Vanier, M.T. (1997): Phenotypic and genetic heterogeneity in Niemann-Pick disease type C: current knowledge and practical implications. *Wien. Klin. Wochenschr.* **109/3**, 67-73

Vanier, M.T., Duthel, S., Rodriguez-Lafrasse, C., Pentchev, P. and Carstea, E.D. (1996): Genetic Heterogeneity in Niemann-Pick C disease: a study using somatic cell hybridization and linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **58**, 118-125

Vanier, M.T., Rodriguez-Lafrasse C., Rousson, R., Duthel, s., Harzer, K., Pentchev, P.G., Revol, A. and Lousot P. (1991): Type C Niemann-Pick disease: biochemical aspects and phenotypic heterogeneity. *Dev. Neurosci.* **13**, 307-14

Vassiliadis, A., Rosenblatt, D.S., Cooper, B.A. and Bergeron, J.J. (1991): Lysosomal cobalamin accumulation in fibroblasts from patient with an inborn error of cobalamin metabolism (cb1F complementation group): visualization by electron microscope radioautography. *Exp. Cell. Res.* **195**, 295-302

Vega, M.A., Segui-Real, B., Garcia, J.A., Cales, C., Rodriguez, F., Vanderkerckhove, J. and Sandoval, I.V. (1991): Cloning, sequencing, and expression of cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J. Biol. Chem.* **266**, 16818-16824

Verheijen, F.W., Verbeek, E., Aula, N., Beerens, C.E.M.T., Havelaar, A.C., Joosse, M., Peltonen, L., Aula, P., Galjaard, H, van der Spek, P.J. and Mancini, G.M.S. (1999): A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat. Genet.* **23**, 462-465

Viitala, J., Carlsson, S.R., Sibert, P.D. and Fukuda, M. (1988): Molecular cloning of cDNAs encoding lamp A, a human lysosomal membrane glycoprotein with apparent Mr approximately equal to 120,000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3743-3747

Vincent, R. and Nadeau, D. (1983): A micromethod for the quantification of cellular proteins in percoll with the coomassie brilliant blue dye-binding assay. *Anal. Biochem.* **135**, 355-362

Waheed, A., Gottschalk, S., Hille, A., Krentler, C., Pohlmann, R., Bräulke, T., Hauser, H., Geuze, H. and Figura, K. von (1988): Human lysosomal acid phosphatase is transported as a transmembrane protein to lysosomes in transfected baby hamster kidney cells. *EMBO J.* **7**, 2351-2358

- Warnock, D.E., Roberts, C., Lutz, M.S., Blackburn, W.A., Young, W.V., Baenzinger, J.U. Jr. and Baenzinger, J.U. (1993): Determination of plasma membrane lipid mass and composition in cultured Chinese hamster ovary cells using high gradient magnetic affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **268**, 10145-10153
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Glick, J.M., Patel, S., Neufeld, E.B., Brady, R.O., Pentchev, P.G. and Strauss III, J.F. (1999a): Niemann-Pick C1 protein: obligatory roles for N-terminal domains and lysosomal targeting in cholesterol mobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 805-810
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Watari, M., Burd, C.G., Patel, S., Pentchev, P.G. and Strauss III, J.F. (2000): Determinants of NPC1 expression and action: key promoter regions. Posttranscriptional control, and the importance of a "cysteine-rich" loop. *Exper. Cell Res.* **259**, 247-256
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Watari, M., Neufeld, E.B., Patel, S., Pentchev, P.G. and Strauss III, J.F. (1999b): Mutations in the leucine zipper motif and sterol-sensing domain inactivate the Niemann-Pick C1 glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **274**, 21861-21866
- Watkins, D. and Rosenblatt, D.S. (1986): Failure of lysosomal release of vitamin B₁₂: a new complementation group causing methylmalonic aciduria (cblF). *Am. J. Hum. Genet.* **39**, 404-408
- Westermeier, R. (2001): 2-D Electrophoresis in Proteome Analysis. European Proteome Seminar Tour 2001 – Frankfurt am Main. Vortrag.
- Wickner, T.W. and Lodish, H.F. (1985): Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science* **230**, 400-407
- Winchester, B., Vellodi, A. and Young, E. (2000): The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment. *Biochem. Soc. Transactions* **28**, 150-154
- Winchester, B.G. (2001): Lysosomal membrane proteins. *Europ. J. Paediatr. Neurol.* **5** (Suppl. A), 11-19
- Wolff, D.A. and Pertoft, H. (1972): The purification of lysosomes from HeLa cells by centrifugation in colloidal silica density gradients. *Biochim. Biophys. Acta* **286**, 197-204
- Youngdahl-Turner, P., Rosenberg, L.E. and Allen, R.H. (1978): Binding and uptake of transcobalamin II by human fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **61**, 133-141
- Zhong, N. (2000): Neuronal ceroid lipofuscinoses and possible pathogenic mechanism. *Mol. Genet. Metab.* **71**, 195-206
- Zhou, X., Thamotharan, M., Gangopadhyay, A., Serdikoff, C. and Adibi, S.A. (2000): Characterization of an oligopeptide transporter in renal lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1466**, 372-378

8 Anhang

Tab. 8.1: Nomenklatur und Eigenschaften lysosomaler Membranproteine.

	LAMP-1	LAMP-2	LIMP-I (LAMP-3)	LIMP-II	Autor
<u>Synonyme</u>					
Mensch	h-lamp-1	h-lamp-2	-	-	Carlsson et al., 1988
	h-lamp-1	h-lamp-2	-	-	Fukuda et al., 1988
	hLAMP-1	hLAMP-2	-	-	Mane et al., 1989
	lamp A	-	-	-	Viitala et al., 1988
	-	-	CD63	-	Metzelaar et al., 1991
	-	-	-	hLGP85	Fujita, 1992
Ratte	-	-	ME 491	-	Hotta et al., 1988
	LIMP-III	-	LIMP-I	LIMP-II	Barriocanal et al., 1986
	lgp 120	lgp 110	-	lgp 80	Lewis et al., 1985
	LGP 107	-	-	-	Himeno et al., 1989
	-	-	-	LIMP II	Vega et al., 1991
	-	-	-	rLGP85	Fujita, 1991
Maus	m-LAMP-1	m-LAMP-2	-	-	Chen et al., 1988
	m-LAMP-1	m-LAMP-2	-	-	Chen et al., 1985
		lgp 110	-	-	Granger et al., 1990
	lgp A	lgp B	-	-	Granger et al., 1990
	-	mLAMP-2	-	-	Cha et al., 1990
	-	-	-	M-LGP85	Tabuchi, 1997
Huhn	CV 24 Antigen	-	-	-	Lippincott-Schwartz und Fambrough 1986
	LEP100	-	-	-	Fambrough et al., 1988
<u>Molekulargewicht</u>					
Mensch	120	120	-	-	Carlsson et al., 1988
	120	120	-	-	Fukuda et al., 1988
	120	120	-	-	Mane et al., 1989
	120	-	-	-	Viitala et al., 1988
	-	-	30-60	-	Metzelaar et al., 1991
	-	-	-	85	Fujita 1992
Ratte	-	-	-	-	Hotta et al., 1988
	90-110	-	35-50	74	Barriocanal et al., 1986
	120	110	-	80	Lewis et al., 1985
	107	-	-	-	Himeno et al., 1989
	-	-	-	74	Vega et al., 1991
	-	-	-	85	Fujita, 1991
Maus	-	-	-	-	Chen et al., 1988
	105-115	100-110	-	-	Chen et al., 1985
	-	110	-	-	Granger et al., 1990
	-	90-110	-	-	Cha et al., 1990
				80	Tabuchi, 1997
Huhn	95-105	-	-	-	Lippincott-Schwartz und Fambrough, 1986
	100	-	-	-	Fambrough et al., 1988

Tab. 8.1: Fortsetzung Teil 1

	LAMP-1	LAMP-2	LIMP-I (LAMP-3)	LIMP-II	Autor
<u>Polypeptidkette (Anzahl Aminosäuren)</u>					
Mensch	-	-	-	-	Carlsson et al., 1988
	416	408	-	-	Fukuda et al., 1988
	-	-	-	-	Mane et al., 1989
	385	-	-	-	Viitala et al., 1988
	-	-	238	-	Metzelaar et al., 1991
	-	-	-	478	Fujita, 1992
	-	-	237	-	Hotta et al., 1988
Ratte	-	-	-	-	Barriocanal et al., 1986
	-	-	-	-	Lewis et al., 1985
	386	-	-	-	Himeno et al., 1989
	-	-	-	478	Vega et al., 1991
	-	-	-	478	Fujita, 1991
Maus	382	-	-	-	Chen et al., 1988
	-	-	-	-	Chen et al., 1985
	-	-	-	-	Granger et al., 1990
	-	390	-	-	Cha et al., 1990
	-	-	-	478	Tabuchi, 1997
Huhn	-	-	-	-	Lippincott-Schwartz und Fambrough, 1986
	414	-	-	-	Fambrough et al., 1988
<u>Core (kDa)</u>					
Mensch	39,5	41,5	-	-	Carlsson et al., 1988
	40	40	-	-	Fukuda et al., 1988
	40-45	-	-	-	Mane et al., 1989
	-	-	-	-	Viitala et al., 1988
	-	-	25	-	Metzelaar et al., 1991
	-	-	-	54	Fujita, 1992
	-	-	25	-	Hotta et al., 1988
Ratte	-	-	-	-	Barriocanal et al., 1986
	-	-	-	-	Lewis et al., 1985
	42	-	-	-	Himeno et al., 1989
	-	-	-	-	Vega et al., 1991
	-	-	-	54	Fujita, 1991
Maus	41,5	-	-	-	Chen et al., 1988
	-	-	-	-	Chen et al., 1985
	-	45	-	-	Granger et al., 1990
	-	43	-	-	Cha et al., 1990
	-	-	-	54	Tabuchi, 1997
Huhn	48	-	-	-	Lippincott-Schwartz und Fambrough, 1986
	-	-	-	-	Fambrough et al., 1988

Tab. 8.1: Fortsetzung Teil 2

	LAMP-1	LAMP-2	LIMP-I (LAMP-3)	LIMP-II	Autor
<u>N-Glykosylierungsstellen</u>					
Mensch	18	16	-	-	Carlsson et al., 1988
	19	16	-	-	Fukuda et al., 1988
	-	-	-	-	Mane et al., 1989
	18	-	-	-	Viitala et al., 1988
	-	-	3	-	Metzelaar et al., 1991
	-	-	-	10	Fujita, 1992
Ratte	-	-	3	-	Hotta et al., 1988
	-	-	-	-	Barriocanal et al., 1986
	18 a)	-	-	-	Lewis et al., 1985
	20	-	-	-	Himeno et al., 1989
	-	-	-	11	Vega et al., 1991
	-	-	-	10	Fujita, 1992
Maus	20	-	-	-	Chen et al., 1988
	-	-	-	-	Chen et al., 1985
	-	17	-	-	Granger et al., 1990
	-	17	-	-	Cha et al., 1990
	-	-	-	11	Tabuchi, 1997
Huhn	-	-	-	-	Lippincott-Schwartz und Fambrough, 1986
	17	-	-	-	Fambrough et al., 1988

a): Schätzwert

Tab. 8.2: **Pipettierschema zur Herstellung eindimensionaler SDS-Polyacrylamidgele verschiedener Gesamtacrylamidkonzentration.**

	<u>Gesamtacrylamidkonzentration [w/v]</u>		
	<u>5.1 %</u>	<u>8.0 %</u>	<u>15.1 %</u>
<u>Trenngel</u>			
30 % [w/v] Acrylamid	2.55 mL	4 mL	7.5 mL
1 % [w/v] N,N'-Methylenbisacrylamid	0.8 mL	1.235 mL	2.35 mL
1.5 M Tris/HCl pH 8.8	3.75 mL	3.75 mL	3.75 mL
Wasser	7.7 mL	5.79 mL	1.2 mL
10 % [w/v] SDS	0.15 mL	0.15 mL	0.15 mL
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	15 µL	15 µL	12.5 µL
25 % [w/v] Ammoniumpersulfat (APS)	60 µL	60 µL	50 µL
<u>Sammelgel</u>			
30 % [w/v] Acrylamid	0.5 mL	0.5 mL	0.8 mL
1 % [w/v] N,N'-Methylenbisacrylamid	0.55 mL	0.55 mL	0.55 mL
0.5 M Tris/HCl pH 6.8	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL
Wasser	2.65 mL	2.65 mL	2.35 mL
10 % [w/v] SDS	50 µL	50 µL	50 µL
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	5 µL	5 µL	5 µL
25 % [w/v] Ammoniumpersulfat (APS)	20 µL	20 µL	20 µL

Tab. 8.3: **Pipettierschema zur Herstellung zweidimensionaler SDS-Polyacrylamidgele verschiedener Gesamtacrylamidkonzentration.**

	<u>Gesamtacrylamidkonzentration [w/v]</u>		
	<u>8.0 %</u>	<u>12.5 %</u>	<u>15.1 %</u>
<u>Trenngel</u>			
30 % [w/v] Acrylamid	4.665 mL	7.292 mL	8.755 mL
1 % [w/v] N,N'-Methylenbisacrylamid	1.44 mL	2.275 mL	2.742 mL
1.5 M Tris/HCl pH 8.8	4.375 mL	4.375 mL	4.375 mL
Wasser	6.755 mL	3.325 mL	1.4 mL
10 % [w/v] SDS	0.175 mL	0.175 mL	0.175 mL
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	17.5 µL	14.58 µL	14.58 µL
25 % [w/v] Ammoniumpersulfat (APS)	70 µL	58.33 µL	58.33 µL
<u>Sammelgel</u>			
30 % [w/v] Acrylamid	0.25 mL	0.4 mL	0.4 mL
1 % [w/v] N,N'-Methylenbisacrylamid	0.275 mL	0.275 mL	0.275 mL
0.5 M Tris/HCl pH 6.8	0.625 mL	0.625 mL	0.625 mL
Wasser	1.325 mL	1.175 mL	1.175 mL
10 % [w/v] SDS	25 µL	25 µL	25 µL
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
25 % [w/v] Ammoniumpersulfat (APS)	10 µL	10 µL	10 µL

Danksagung

Herrn Prof. Dr. A. Hasilik, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstanden ist, danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, seine wertvollen Ratschläge, die viele Geduld und das große Interesse an diesen Untersuchungen.

Frau Prof. Dr. K. Becker-Brandenburg danke ich sehr herzlich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und ihrer Begutachtung.

Den Damen im Bereich der Plazentaaufarbeitung danke ich für ihren Einsatz, ohne den diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Den Damen und dem Herrn der „Gelküche“ danke ich für die Herstellung unzähliger SDS-Polyacrylamidgele und die Betreuung der Elektrophorese.

Ferner möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Hasilik für das gute Arbeitsklima bedanken. Mein besonderen Dank gilt Frau Gertraud Jarosch und den Herren Dr. Eric Sarnighausen sowie Dr. Stephan Six.

Herzlicher Dank richtet sich an Frau Dr. Sabine Schulz und die Herren Matthias Lentz sowie Dr. Hans-Gerhard Löffler für das Korrekturlesen und die konstruktiven Hinweise.

Der Abschließende Dank gilt meinen Eltern, die mir meine Ausbildung zur Diätassistentin und mein Studium der Ernährungs- und Haushaltswissenschaften finanziell ermöglichten.